

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Р. Геннис

БИОМЕМБРАНЫ

Молекулярная структура
и функции



Издательство «Мир»

БИОМЕМБРАНЫ
МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА
И ФУНКЦИИ

SPRINGER ADVANCED TEXT IN CHEMISTRY
CHARLES R. CANTOR, SERIES EDITOR

ROBERT B. GENNIS

Biomembranes
Molecular Structure and Function

Геннис

БИОМЕМБРАНЫ

Молекулярная структура
и функции

Перевод с английского
канд. хим. наук Л.И. Барсукова,
канд. биол. наук А.Я. Мулкиджаняна,
А.Л. Семейкиной и
канд. биол. наук В.Д. Следя

Springer-Verlag
New York Berlin Heidelberg Tokyo



Москва «Мир» 1997

УДК 576.32/.36

ББК 28.07

Г 34

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Геннис Р.

Г 34 Биомембраны: Молекулярная структура и функции: Пер. с
англ. — М.: Мир, 1997. — 624 с., ил.

ISBN 5-03-002419-0

В книге известного американского специалиста на основе новейших данных изложены современные представления о структуре мембран и их отдельных компонентов, описаны подходы к анализу механизмов работы мембранных систем клетки. Книга может быть использована как руководство по мембранологии.

Для специалистов — биохимиков, биофизиков, физиологов, фармакологов и студентов старших курсов биологических факультетов.

ББК 28.07

Редакция литературы по биологии

Эта книга принадлежит к хорошо зарекомендовавшей себя серии “Springer Advanced Text in Chemistry”. Ее автор — один из известнейших мембранологов США, широко применяющий генетические и энзимологические подходы к изучению мембранных ферментов бактерий. Однако содержание монографии далеко выходит за рамки конкретных интересов Р. Генниса как экспериментатора, претендуя на исчерпывающий охват темы, указанной в заглавии. В книге изложены новейшие сведения о структуре биологических мембран и приведены примеры, когда структурные данные позволяют приблизиться к пониманию механизмов работы мембранных систем живой клетки.

Книга рассчитана на широкий круг читателей самых разных специальностей и уровней подготовки — биохимиков, биофизиков, физиологов, фармакологов и медицинских химиков. Она может использоваться как учебное пособие аспирантами и студентами.

В.П. Скулачев, академик РАН

ISBN 5-03-002419-0 (русск.)
ISBN 0-387-96760-5 (англ.)

© 1989 by Springer-Verlag
New York Inc. All Rights
Reserved. Authorized translation
from English language edition
published by Springer-Verlag
Berlin Heidelberg New York
Tokyo
© перевод на русский язык,
коллектив переводчиков, 1997

*Посвящаю моей семье:
Джой и Сильвии, родителям,
Кристине, жене,
и
Эммелине Розе, дочери,
за все то счастье,
которое она нам принесла*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Исследования мембран стали «точкой приложения» самых разных научных дисциплин — от биофизики до молекулярной биологии. В царство мембран можно попасть, будучи физиком, гениальным инженером или специалистом в любой междисциплинарной области науки. Поэтому написать книгу, которая удовлетворила бы интересы столь широкой аудитории, — это большая ответственность. Однако каждый, кто хочет находиться в курсе современного состояния исследований в области биологических мембран, должен обладать определенным объемом знаний и быть знакомым с некоторыми фундаментальными принципами. Именно на этих основополагающих моментах и сконцентрировал я свои усилия при написании книги. Мой взгляд — это взгляд биохимика, и в отобранном мною материале центральное место занимают вопросы молекулярной структуры мембран и взаимосвязи между структурой и функцией. Эта книга будет полезна как студентам старших курсов, так и тем, кто хочет самостоятельно изучить вопросы, связанные со структурой и функцией мембран. В ней содержится основополагающая информация и по таким специальным разделам, как транспорт, рецепторы, передача сигналов или биогенез мембран. Список литературы охватывает работы до конца 1987 г.

Я стремился написать книгу, которая вызвала бы интерес и у новичка, только приступающего к изучению мембранологии, и у активно работающего в ней исследователя. Следуя этой цели, я попытался упорядочить весь необозримый материал, с тем чтобы проиллюстрировать взаимосвязь исследований, проведенных в различных областях мембранологии, и выявить их общую концептуальную основу. Я составил весьма обширный список литературы, чтобы читатель мог при необходимости обратиться к первоисточникам и глубже изучить интересующий его вопрос. Возможно, некоторым читателям покажется, что материал и так излишне детализирован, но я считаю, что таким и должно быть издание повышенного уровня. Всегда есть возможность лишь бегло просмотреть те разделы, которые вас в данный момент не очень интересуют.

Я хотел бы поблагодарить тех, кто оказывал мне помощь и поддержку в течение долгого, иногда казавшееся бесконечным, процесса создания этой книги. Мои друзья и коллеги любезно согласились прочитать отдельные разделы рукописи и помогли мне поддержкой и советом, а также указали на ошибки. Это Richard Anderson, Vyto Bankaitis, Lewis Cantley, Charles Cantor, Tony Crofts, John Cronan, Pieter Cullis, Tom Ebrey, Don Engelman, Gerry Feigenson, Sidney Fleischer, George Fortes, Michael Glaser, Neil Green, Lynne Guildensoph, Ari Helenius, Rick Horwitz, Wayne Hubbel, Ken Jacobson, Ron Kaback, Jim Kaput, Steve Kaufman, David Kranz, Vishnawath Lingappa, Mark McNamee, Chris Miller, Eric Oldfield, Elliot Ross, Ted Steck, John Whitmarsh. Я особенно признателен J. Keith Wright, оказавшей неоценимую помощь в редактировании рукописи, и Ann Dueweke, которая помогла получить разрешение на использование уже опубликованных материалов и привела в порядок список литературы, а также Karen Shannon из компании Precision Graphics (Champaign, Illinois) за изготовление всех рисунков. Благодарю также всех тех, кто оказал помощь в считывании окончательного текста рукописи: Kathe Andrews, Rose Beci, Visala Chepuri, Tom Dueweke, Hong Fang, John Hill, Tamma Kaysser, Kiyoshi Kita, Laura Lemieux, Gail Newton, Kris Oden, Petr Pejza, Jim Shapleigh, Steve Van Doren, Cecile Vibat, Melissa White, Chris Yun.

И наконец, я в высшей степени благодарен за неоценимую техническую помощь, которую оказали мне сотрудники отдела физической химии Иллинойского университета Evelyn Carlier, Jan Williams, Karen McLague, Betty Brillhart.

Урбана, Иллинойс

Роберт Б. Геннис

Глава 1

ВВЕДЕНИЕ: СТРУКТУРА И СОСТАВ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

1.1. Роль мембран и их разнообразие

Мембраны играют ключевую роль как в структурной организации, так и в функционировании всех клеток — прокариотических и эукариотических, растительных и животных. Мембраны формируют внутриклеточные компартменты (отсеки), с их помощью происходит разделение содержимого компартментов и окружающей их среды. Но если бы это была единственная функция мембран, они не были бы для нас столь интересны. Мембраны не только разделяют клетку на отдельные компартменты, но и участвуют в регуляции всех связей и взаимодействий, которые осуществляются между наружной и внутренней сторонами этих компартментов. Это может проявляться в виде физического переноса ионов или молекул через мембрану (внутри компартмента или из него) или в форме передачи информации при помощи конформационных изменений, индуцируемых в мембранных компонентах. Кроме того, с мембранами связаны многие клеточные ферменты. Некоторые из них катализируют трансмембранные реакции, когда реагенты находятся по разные стороны мембраны или когда каталитический акт сопровождается транспортом молекул. Другие ферменты образуют своеобразные комплексы, которые осуществляют цепь последовательных превращений, причем благодаря тому, что эти ферменты располагаются в плоскости мембраны, повышается эффективность всего процесса. Имеются ферменты, которые, действуя на мембраносвязанные субстраты, участвуют тем самым в биосинтезе мембран. С участием мембран в той или иной степени осуществляется большинство жизненно важных клеточных функций, например протекают такие разные процессы, как репликация прокариотической ДНК [807, 777, 803], биосинтез белков и их секрция, биоэнергетические процессы и функционирование систем гормонального ответа.

Данные, полученные при изучении клеток млекопитающих методом электронной микроскопии, свидетельствуют о наличии широко развитой сети внутриклеточных мембранных образований, которая занимает значительную часть внутреннего объема клетки. Сейчас уже не вызывает сомнений, что основные принципы структурной

организации всех этих мембран по сути одинаковы. Более того, эти принципы соблюдаются также и в случае мембран растительных и бактериальных клеток. Основные закономерности, установленные Робертсоном в конце 1950-х гг. [1231], позволяют нам переносить результаты, полученные при исследовании одной мембранной системы (например, мембраны эритроцитов), на другие системы (конечно, со всеми необходимыми предосторожностями). Естественно, учет специфики здесь необходим, поскольку, как это ни парадоксально звучит, одной из самых характерных особенностей мембран является их чрезвычайное разнообразие. Такое разнообразие обусловлено прежде всего разнообразием белков, присутствующих в каждой мембране, и способов их взаимодействия друг с другом и с компонентами цитоплазмы. Эти взаимодействия в конечном счете проявляются в специфической морфологии мембранных образований (таких, как микроворсинки кишечного эпителия или тубулярный эндоплазматический ретикулум) и могут быть связаны с латеральной гетерогенностью той или иной мембраны (разд. 4.5). Таким образом, основная задача заключается в том, чтобы, опираясь на общие представления о структуре и функциях мембран, выявить молекулярно-биологические основы их структурного и функционального разнообразия.

Успехов в исследовании мембран удалось достичь благодаря сравнительному изучению мембран из множества разнообразных организмов. Бактериальные клетки имеют довольно простую наружную оболочку, содержащую одну или две мембраны, которые можно модифицировать генетически или путем изменения условий роста клеток. Вирусы с оболочкой внедряются в клетки животных благодаря слиянию с плазматической мембраной последних (разд. 9.5.2) и высвобождаются из клетки-хозяина, отпочковываясь от нее (разд. 4.5.3). Изучение созревания вирусных белков позволяет узнать много нового о процессах биосинтеза мембранных белков (разд. 10.2).

Эукариотические клетки содержат различные мембранные органеллы, причем каждая мембрана уникальна по своему составу, особенностям структурной организации и по характеру выполняемых функций. Для того чтобы понять мотивы исследований, описанных в последующих главах, необходимо получить некоторые общие представления о биологических функциях различных мембранных систем. На рис. 1.1 схематически изображены мембраны, обычно представленные в животной и растительной клетках. Заметим, что внешний вид органелл неодинаков в клетках разного типа. Кроме того, некоторые клетки, например палочки сетчатки, а также клетки скелетных мышц, имеют высокоспециализированные мембраны, выполняющие уникальные функции.

1. **Плазматическая мембрана.** Плазматическая мембрана образует границу, на которой осуществляется контакт клетки с ее окру-

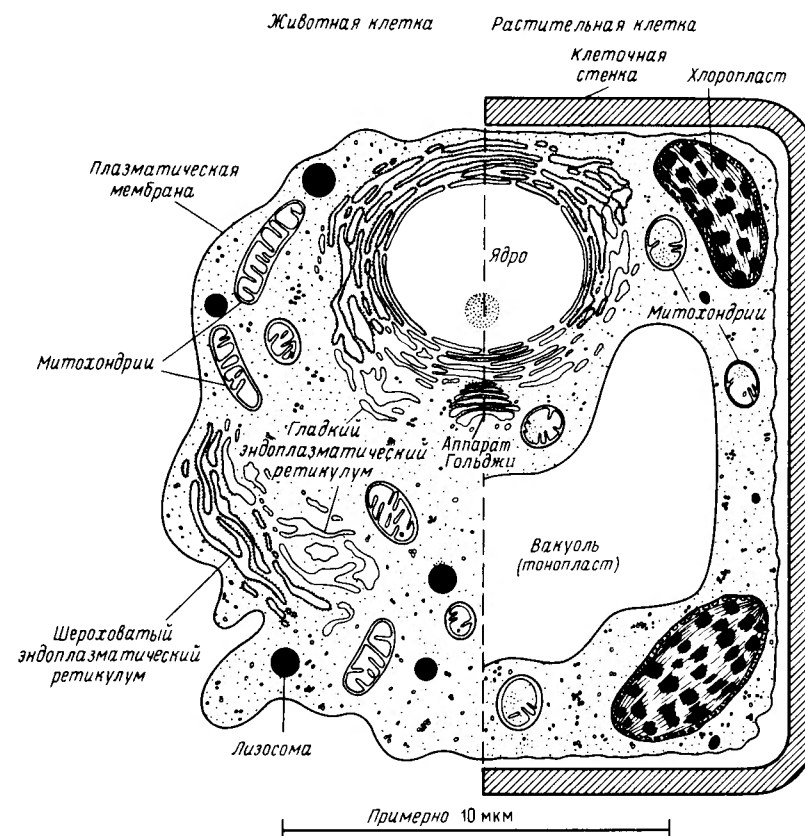


Рис. 1.1. Схематическое изображение органелл эукариотических клеток животных и растений на основании данных электронной микроскопии [425a].

нием. Она содержит специализированные компоненты, участвующие в межклеточных контактах и взаимодействиях, в системах гормонального ответа и транспорта как малых, так и больших молекул из клетки и внутрь ее. Однако и сама плазматическая мембрана состоит из специализированных участков, которые имеют различное окружение. На рис. 1.2 изображены *апикальный* и *базолатеральный* участки плазматической мембраны гепатоцитов и поляризованных эпителиальных клеток. Апикальная мембрана контактирует с какой-либо внутриклеточной средой. Так, у гепатоцитов она обращена в просвет желчных канальцев, а у эпителиальных клеток кишечника — в просвет желудочно-кишечного тракта. Она может иметь специализированные структуры, например *микроворсинки*; последние в некото-

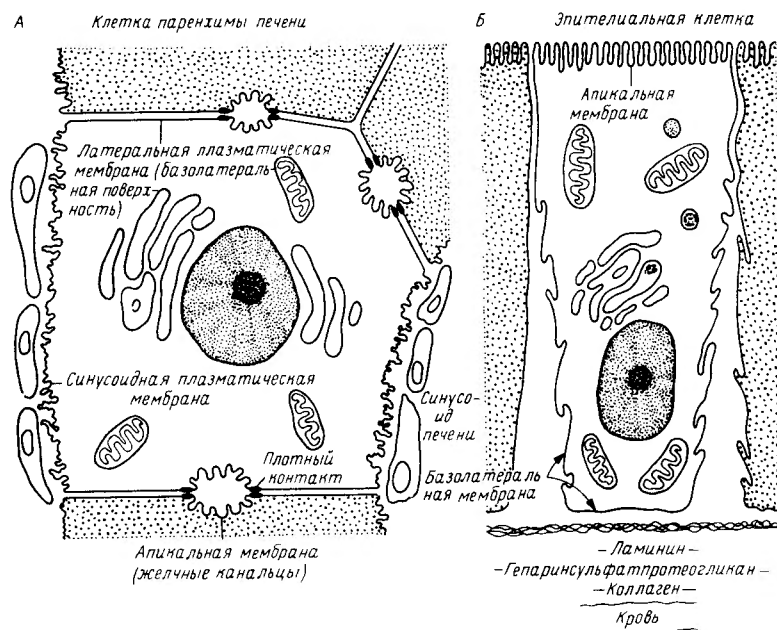


Рис. 1.2. Схематическое представление доменной организации плазматической мембраны гепатоцита (А) и поляризованной эпителиальной клетки (Б).

рых всасывающих клетках образуют щеточную каемку. Микроворсинки значительно увеличивают площадь поверхности мембраны, в результате чего повышается эффективность мембранного транспорта. Базолатеральная мембрана находится в контакте с другими клетками (в этом случае она называется латеральной или контактной) или обращена в просвет кровеносных сосудов (и называется синусоидной мембраной). Латеральная и синусоидная мембраны гепатоцитов различаются как по своей морфологии, так и биохимически [402].

Базолатеральная мембрана гепатоцитов имеет также специализированные структуры, ответственные за межклеточную адгезию и транспорт.

Плотные контакты герметизируют область соприкосновения клеток и предотвращают перемешивание содержимого желчных канальцев и кровеносных сосудов.

Щелевые контакты содержат множество регулярно расположенных пор, которые позволяют небольшим молекулам проходить через плазматические мембраны двух соприкасающихся клеток. Электроно-микроскопические и биохимические исследования выявили характерные детали молекулярной организации этих пор, показав, что

каждая из них содержит гексагонально упакованные белковые субъединицы (разд. 8.2.1).

Десмосомы также обеспечивают клеточную адгезию и участвуют во взаимодействии плазматической мембраны с элементами цитоскелета (разд. 4.3).

Апоикальный, латеральный и синусоидный участки плазматической мембраны различаются морфологически и имеют уникальный состав и функции. Если клетки разрушить в мягких условиях, то можно выделить и очистить фракции, отвечающие этим участкам плазматической мембраны [402]. Как на молекулярном уровне обеспечивается в клетке существование таких специализированных доменов, пока неясно, хотя известно, что не все их компоненты способны свободно диффундировать между доменами (разд. 4.5.1).

2. Ядерная мембрана. Ядерная оболочка клетки, находящейся в интерфазе, на электронных микрофотографиях имеет вид двух элементарных мембран с узким просветом между ними, называемым перинуклеарным пространством [459]. Эта мембрана происходит из эндоплазматического ретикулума (см. ниже) и, по-видимому, неразрывно связана с ним. Наиболее характерными морфологическими признаками являются порообразные структуры. Они имеют диаметр около 600 Å и состоят из морфологически четко выявляемых компонентов, образующих октагональную решетку [1483] (разд. 8.2.2). В том месте, где расположены эти структуры, внутренняя и наружная ядерные мембраны выглядят слившимися. Полагают, что поры позволяют комплексам мРНК—белок переходить из ядра в цитоплазму, а регуляторным белкам перемещаться в обратном направлении, из цитоплазмы в ядро. Биохимические данные о ядерной оболочке весьма немногочисленны.

3. Эндоплазматический ретикулум (ЭР). Это сложная сеть цистернообразных или трубчатых структур, которая занимает значительную часть внутреннего объема обычной животной клетки. Основная роль ЭР состоит в том, что он служит местом биосинтеза белков, которые затем секретируются, включаются в лизосомы или в плазматическую мембрану. Потенциально опасные для клетки гидролитические ферменты, которые должны секретироваться или накапливаться в лизосомах, подвергаются в ЭР процессингу до зрелой формы. С ЭР часто бывают связаны рибосомы, в результате чего на электронных микрофотографиях он выглядит шероховатым (шероховатый ЭР). Сложные процессы, в ходе которых осуществляется синтез белков (мембранных, секретируемых или лизосомных), их превращение в зрелую форму и направленная доставка к месту назначения, описаны в гл. 10.

Области ЭР, не содержащие рибосом, называются гладким ЭР. Здесь осуществляется биосинтез стеролов, протекают реакции детоксикации и происходит десатурация жирных кислот. Все эти процессы

входят в сложную, согласованную систему транспорта электронов, осуществляемого при участии цитохромов b_5 и P450 (гл. 6).

4. *Аппарат Гольджи*. Эта органелла состоит из сети утолщенных мешков (цистерн), собранных в стопки. Основная его функция заключается в посттрансляционной модификации гликопротеинов, синтезированных в эндоплазматическом ретикулуле и предназначенных для секреции, включения в плазматическую мембрану или доставки в лизосомы. Эти органеллы содержат гликозидазы и гликозилтрансферазы, которые вступают в действие последовательно, по мере того как белок, подвергаемый процессингу, перемещается (вероятно, с помощью мембранных везикул) от начала аппарата Гольджи (*цис-область*) до его конца (*транс-область*). Фактически аппарат Гольджи состоит из совокупности отдельных мембран, образующих цистерны. Эти мембраны, которые можно выделить, характеризуются определенным набором ферментов [1248] (см. разд. 10.2; рис. 10.4). Механизмы транспорта мембран и секретируемых белков через аппарат Гольджи рассмотрены в гл. 10.

5. *Лизосомы*. Эти органеллы ответственны за деградацию макромолекул и содержат ряд гидролитических ферментов, таких, как протеазы и липазы [316]. Вещества, захваченные клеткой путем эндоцитоза, которые необходимо расщепить, доставляются в лизосомы с помощью везикул. В лизосомах происходит также расщепление клеточных компонентов в ходе их обычного круговорота. Как осуществляются синтез лизосомных ферментов, их маркировка для доставки в лизосомы и последующий транспорт — изучено достаточно хорошо. Эти процессы рассматриваются в гл. 10.

6. *Пероксисомы*. Эти органеллы содержат окислительные ферменты, участвующие в деградации малых молекул, таких, как аминокислоты, ксантин и, в особенности, жирные кислоты [933]. Их название связано с присутствием в них каталазы, которая разлагает перекиси, образующиеся как побочные продукты при реакциях окисления.

7. *Митохондрии*. В этих органеллах осуществляется окислительное фосфорилирование, в результате чего в ходе окисления субстратов, таких, как NADH или сукцинат, образуется АТФ. Митохондрии образованы двумя мембранами, разделенными некоторым промежутком. Внутренняя область митохондрий называется матриксом (см. рис. 10.1). Внутренняя мембрана образует складки в виде перегородок, называемых кристами, и содержит ферменты, участвующие в транспорте электронов и синтезе АТФ. В гл. 6 обсуждаются роль диффузии в плоскости мембраны компонентов цепи электронного транспорта и ее функциональное значение. Вопросы, связанные с синтезом белков митохондрий, который происходит в цитоплазме, и с их доставкой в один из митохондриальных компартментов или в одну из мембран, рассматриваются в гл. 10.

8. *Хлоропласты*. Это органеллы, содержащие фотосинтетический аппарат. Они имеют наружную оболочку, образуемую двумя мембранами, и внутреннюю область — строму. В строме находятся тилакоидные мембраны, где локализованы компоненты системы фотосинтеза. На отдельных участках тилакоидные мембраны плотно упакованы в стопки, а на других обращены непосредственно к строме (рис. 4.8). Состав плотноупакованных и обращенных в строму доменов тилакоидной мембраны различен, что указывает на латеральную гетерогенность этой мембраны (разд. 4.5.2). Энзимология фотосинтезирующей цепи электронного транспорта обсуждается в разд. 6.6.

Следует подчеркнуть, что при изучении каждой из мембран, упомянутых выше, а также и других специализированных мембран из клеток животных, растений или бактерий возникает целый комплекс важных и интересных вопросов, требующих своего решения, и открываются широкие возможности для биохимических исследований. Другие мембранные системы, представляющие интерес в этом отношении, будут описаны в последующих главах книги.

1.2. Исторический очерк

Тот факт, что плазматическая мембрана, окружающая клетки, представляет собой вполне определенную структуру, был осознан в середине XIX столетия. На исходе этого столетия Овертон обратил внимание на корреляцию между скоростью, с которой небольшие молекулы проникают в растительные клетки, и их коэффициентом распределения между маслом и водой [1112]; это привело его к мысли о липидной природе мембран. В 1925 г. Гортер и Грендел [532] предположили, что липиды в мембране эритроцитов образуют биомолекулярный слой (липидный бислой). Эта идея возникла на основе результатов элегантного и простого эксперимента. Липиды эритроцитов экстрагировали ацетоном и затем в кювете Лэнгмюра (см. рис. 2.23) получали из них тонкую пленку на поверхности воды. С помощью поплавка сжимали слой липидных молекул на границе раздела вода—воздух до тех пор, пока этот слой не начинал оказывать сопротивление дальнейшему сжатию; это явление было объяснено образованием плотноупакованной мономолекулярной липидной пленки. Измерение площади, занимаемой липидами, и сравнение ее с площадью поверхности эритроцитов, из которых эти липиды были экстрагированы, дали соотношение 2:1. Отсюда был сделан вывод, что мембрана эритроцитов состоит из липидных молекул, расположенных в два слоя. По-видимому, этот вывод Гортера и Грендела оказался правильным только благодаря взаимной компенсации ошибок [64], однако в историческом плане эта работа имела

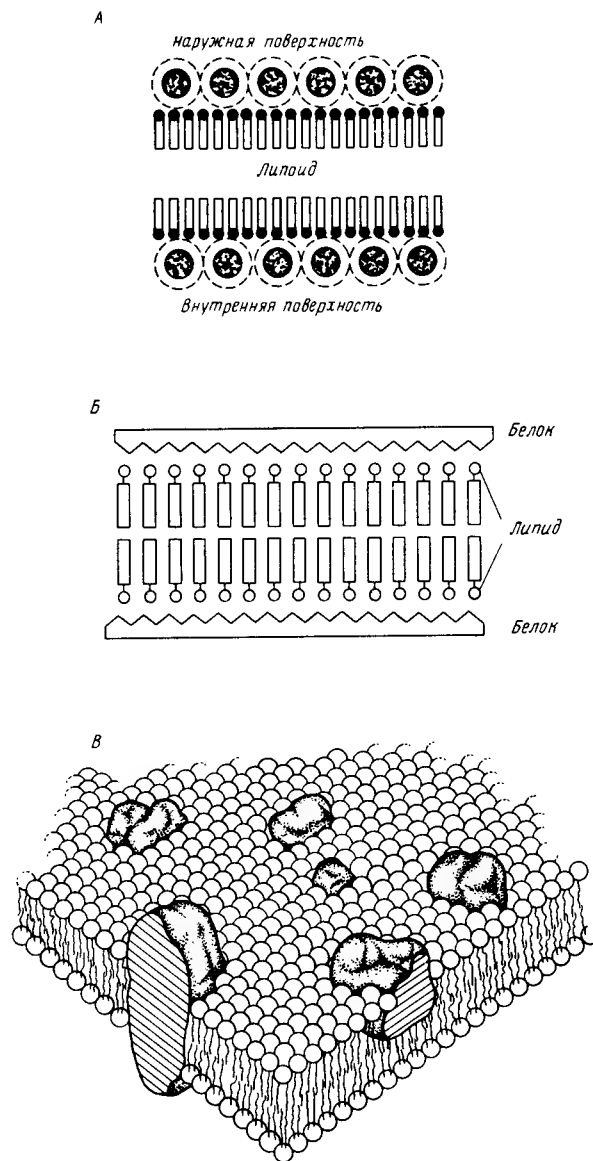


Рис. 1.3. Три модели структурной организации биологических мембран, оказавшие влияние на развитие всей науки о мембранах (см. текст). А. Модель Дэвсона—Даниелли. Б. Модель унитарной мембраны Робертсона. В. Модель жидкостно-мозаичной мембраны Сингера и Николсона. Из работ [279] (А), [1230] (Б) и [1349] (В). Рис. В предоставлен д-ром Singer.

большое значение, поскольку с тех пор концепция липидного бислоя как структурной основы биологических мембран стала доминирующей и на самом деле оказалась верной.

Концепция бимолекулярной липидной мембраны получила дальнейшее развитие в предложенной в 1935 г. модели Дэвсона—Даниелли, или модели «сэндвича», в которой предполагалось, что белки покрывают поверхность липидного бислоя [279] (рис. 1.3). Это была необыкновенно удачная модель, и в течение последующих 30 лет многочисленные экспериментальные данные, особенно полученные с помощью дифракции рентгеновских лучей и электронной микроскопии (см. следующий раздел), полностью подтвердили ее адекватность. Однако тогда же обнаружилось, что мембраны выполняют огромное множество функций, и чтобы объяснить этот феномен, исходная модель Дэвсона—Даниелли неоднократно подвергалась модификациям [см., например, 1387, 425, 880, 1229, 1500].

Быстрый прогресс в мембранологии, в результате которого сформировались современные представления, был достигнут в значительной мере благодаря успехам в изучении свойств мембранных белков. Электронно-микроскопические исследования с применением метода замораживания—скальвания (см. следующий раздел) показали, что в мембраны встроены глобулярные частицы [135, 136, 162]. Тем временем биохимикам с помощью детергентов удалось диссоциировать мембраны до состояния функционально активных «частиц» [542, 543, 1501]. Данные спектральных исследований указывали, что для мембранных белков характерно высокое содержание α -спиралей и что они, вероятно, образуют глобулы, а не распределены в виде монослоя на поверхности липидного бислоя [836, 1543]. Неполарные свойства мембранных белков [543, 1216] наводили на мысль о наличии гидрофобных контактов между белками и внутренней неполярной областью липидного бислоя. Тогда же были разработаны методы, позволившие выявить текучесть липидного бислоя [468]. Сингер и Николсон свели воедино все эти идеи, создав жидкостно-мозаичную модель. В рамках этой модели мембрана представляется как текучий фосфолипидный бислой, в который погружены свободно диффундирующие белки [1348, 1349]. Прежняя модель Дэвсона—Даниелли была статичной и успешно объясняла имевшиеся в то время структурные данные, полученные с довольно низким разрешением (см. следующий раздел). В то же время начиная с 1970 г. большое внимание стало уделяться изучению динамических свойств и их взаимосвязи с мембранными функциями. В последние годы жидкостно-мозаичная модель тоже подверглась модификации, и этот процесс будет продолжаться. В частности, теперь стало ясно, что не все мембранные белки свободно диффундируют в жидком липидном бислое [690] (см. гл. 5). Имеются данные о существовании латеральных доменов в самой мембране [693] (см. гл. 4). Тщательно изучается также

роль цитоскелета (гл. 4). Становится все очевиднее, что некоторые участки мембран, по-видимому, отличаются по своей структуре от классического липидного мозаичного бислоя [265]. Тем не менее в обозримом будущем жидкостно-мозаичная модель в ее разных модификациях будет служить в качестве концептуальной основы для многих мембранных исследований.

1.3. Морфология мембран

Важную роль в выяснении морфологии мембран сыграли два метода: дифракция рентгеновских лучей и электронная микроскопия. Именно с их помощью была подтверждена правильность бислойной модели. Однако следует иметь в виду, что при выяснении детальной картины молекулярной организации мембран оба этих метода сталкиваются с рядом ограничений.

1.3.1. ДИФРАКЦИЯ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ

При исследовании высокоупорядоченных кристаллических образцов с помощью метода дифракции рентгеновских лучей удается получить информацию о структуре с высоким разрешением. В случае же малоупорядоченных препаратов возможности этого метода ограничены. Некоторые специализированные мембранные системы уже имеют регулярную структуру, и потому их можно изучать рентгеноструктурными методами. Примером такого рода служит миелиновая оболочка периферических нервных волокон; она представляет собой мембрану, которая, многократно оборачиваясь вокруг аксона, формирует регулярную систему из концентрических мембранных структур. Исследования дифракции рентгеновских лучей на миелине, проведенные еще в 30-х гг., подтверждают адекватность бислойной модели мембран [1299, 427]. К такому же выводу приводит и изучение наружного сегмента палочек сетчатки позвоночных [108], которые представляют собой природные упорядоченные мембранные системы (диски), а также искусственно упорядоченных систем, которые образуются при коллапсировании в условиях центрифугирования мембранных везикул, полученных из митохондрий [1449] и эритроцитов [426]. Во всех этих случаях наблюдалось сходное распределение электронной плотности в мембране, показанное на рис. 1.4.

Для интерпретации рентгеноструктурных данных необходимо определить не только интенсивности рефлексов, но и их фазы. В случае регулярно упакованных мембранных систем задача значительно упрощается, поскольку эти системы состоят из повторяющихся элементов с центральной симметрией [109]. Полученные данные показывают, что структура всех мембран сходна: они имеют гидрофоб-

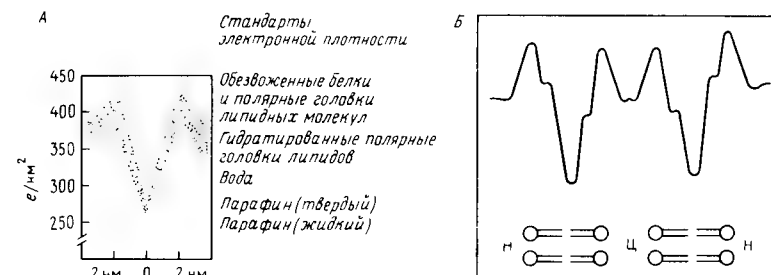


Рис. 1.4. Распределение электронной плотности в мембранах, полученное по данным рентгеноструктурного анализа [425а, 1057b]. А. Схематическое изображение распределения электронной плотности; указаны соединения, служившие стандартами электронной плотности. Б. Распределение электронной плотности в миелине, который представляет собой центросимметричную систему, образуемую парой соприкасающихся между собой мембран. На схеме, отвечающей наблюдаемому распределению электронной плотности, буквой «Ц» обозначена область соприкосновения внутренних поверхностей этих мембран, а буквой «Н» — их наружные поверхности.

ную внутреннюю область с низкой электронной плотностью и два слоя полярных группировок с высокой электронной плотностью. Рентгеноструктурные данные, полученные для разных мембран, различаются лишь незначительно, несмотря на большие различия в содержании в них белка (от 20 до 80%). Хотя рентгеноструктурные данные позволяют получить некоторую информацию о том, как расположена в мембране основная масса мембранных белков (интегральных или периферических), в целом метод рентгеноструктурного анализа не дает детальной молекулярной картины.

Уилкинс и др. [1586] отметили в 1971 г., что метод дифракции рентгеновских лучей можно использовать и для изучения водных дисперсий мембран и фосфолипидов. При этом рефлексы, порождаемые полярными областями на обеих сторонах бислоя, позволяют найти его толщину, равную расстоянию между полярными головками (около 36 Å для чистых фосфолипидов), а по рефлексам, порождаемым упорядоченными углеводородными цепями, можно определить расстояние между этими цепями (около 4,2 Å в высокоупорядоченном состоянии). И в этом случае мембранные препараты, полученные из разных источников, дали сходную дифракционную картину, что подтверждает универсальность бислойной модели.

Невозможность получения с помощью метода дифракции детальной молекулярной картины ограничивает применение этого метода для изучения биологических мембран. Однако он может быть весьма полезен при исследовании упорядоченных липидно-водных систем [1334].

1.3.2. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Просвечивающая электронная микроскопия тонких срезов миеллина, а фактически и всех остальных мембран, выявляет характерную трехслойную структуру, состоящую из двух электроноплотных полос, разделенных промежутком около 80 Å. Такая картина получается в значительной мере в результате обработки препаратов четырехокисью осмия, обычно применяемой в этом методе [956]. Робертсон назвал наблюдаемую структуру «унитарной» [1231, 1230], чтобы подчеркнуть ее универсальность, и хотя молекулярные механизмы прокрашивания мембран осмием неизвестны, эта структура рассматривалась как подтверждение справедливости бислойной модели мембраны. Ясно, однако, что при подготовке препаратов для просвечивающей электронной микроскопии мембраны могут подвергаться неблагоприятным воздействиям. В частности, известно, что обработка четырехокисью осмия приводит к значительной потере белка из эритроцитарной мембраны [956]. И хотя наблюдаемая при этом трехслойная структура в некоторой степени отражает организацию бислойных мембран, более детальные сведения относительно локализации белков этим методом получить не удастся.

Некоторую информацию о расположении мембранных белков дали новые методы, ставшие теперь уже «классическими», — методы замораживания—скалывания и замораживания—травления. В этих случаях препараты быстро замораживают, не подвергая их при этом каким-либо повреждающим воздействиям, как при получении тонких срезов. Процесс подготовки препарата включает следующие операции [432] (рис. 1.5).

1. После замораживания образец, представляющий собой суспензию клеток или мембран, скалывают с помощью ножа при низкой температуре ($-100\text{ }^{\circ}\text{C}$) в глубоком вакууме. Возникающие при скалывании усилия приводят к образованию среза, проходящего через образец. Оказалось, что, когда плоскость среза проходит через мембрану, последняя раскалывается преимущественно по своей срединной области и расщепляется на две половинки. В результате на образовавшихся плоскостях скола обнажается внутренняя область мембраны.

2. При необходимости образец подвергают травлению — проводят обычную возгонку льда в вакууме. Это позволяет лучше визуализировать поверхностные структуры клеточных мембран.

3. После этого получают так называемую реплику с обнаженной поверхности. Именно эту реплику и изучают под электронным микроскопом. Для получения реплики сначала напыляют на образец платину под углом около 45° , чтобы выявить топологические характеристики препарата. Затем платиновой реплике придают механическую прочность, нанеся на нее слой углерода. После этого препарат оттаивают, реплика всплывает, и ее вылавливают с помощью специальной сеточки.

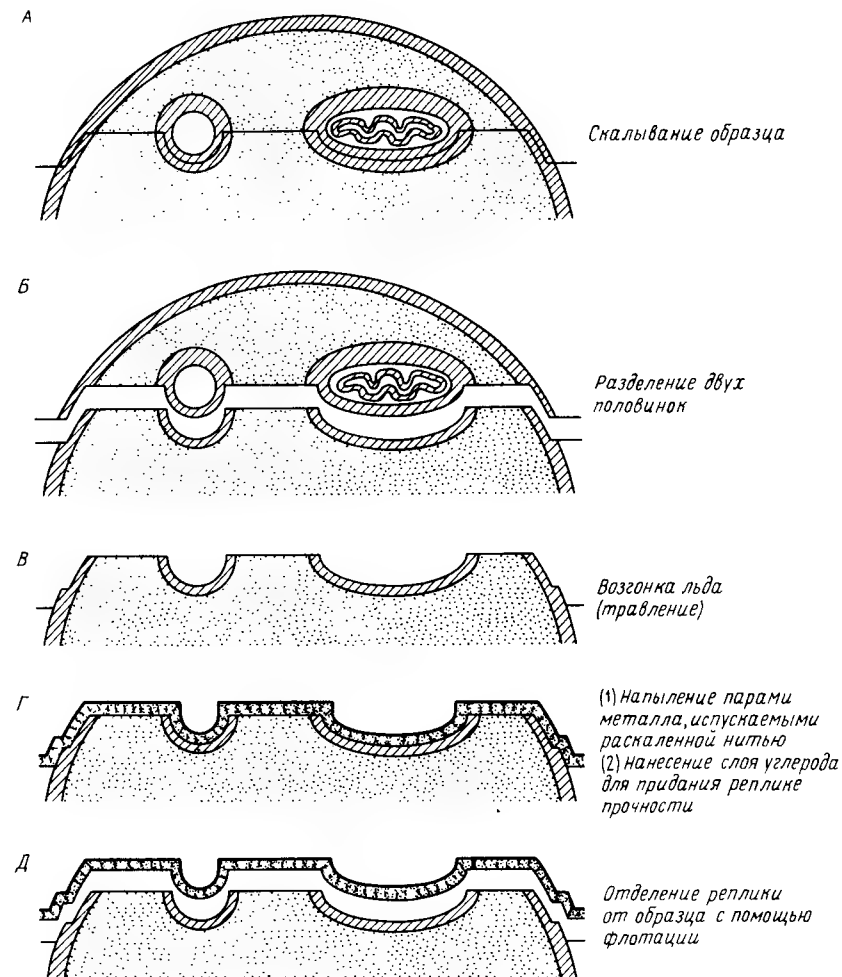


Рис. 1.5. Исследование мембран методом замораживания—скалывания [698]. А. Плоскость скола замороженной клетки частично проходит через центральную часть различных мембран. Б. Разъединение двух половинок скола. В. Образец подвергают травлению для выявления деталей поверхности слоя. Г. На образец напыляют слой платины, а затем слой углерода; таким образом получается реплика с поверхности образца. Д. Эту реплику отделяют от препарата и исследуют под электронным микроскопом.

Наиболее характерные структуры, наблюдаемые при изучении мембран методом замораживания—скалывания, — это многочисленные внутримембранные частицы диаметром от 80 до 100 Å, лежащие в плоскости мембранных сколов. Обычно они расположены хаотично, но иногда образуют группы. Многочисленные исследования показали, что эти частицы, возможно, являются мембранными белками. Любопытно, что при электронной микроскопии тонких срезов подобные структуры не обнаруживаются. Реплики, полученные от двух половинок расщепленной мембраны, не всегда бывают топологически комплементарными. Это означает, что некоторые частицы связаны только с одной из половин мембраны. Данные, полученные методом замораживания—скалывания, широко использовались Сингером и Николсоном при создании жидкостно-мозаичной модели мембран, поскольку они убедительно показывали, что глобулярные белки находятся не только на поверхности мембраны, но и внутри бислоя [1349].

Дополнение 1.1. Частицы, обнаруживаемые методом замораживания—скалывания

На рис. 1.6 приведена электронная микрофотография препарата протеолипосом, реконструированных из яичного фосфатидилхолина и нефракционированного препарата белка полосы 3 из мембраны эритроцитов человека; препарат получен методом замораживания—скалывания [1625, 1626]. Белок полосы 3 является основным белковым компонентом мембраны эритроцитов и, как известно, осуществляет перенос анионов (см. разд. 8.3.3). Если фосфолипидные везикулы не содержат этого белка, то полученные препараты замороженных сколов имеют гладкую поверхность. При встраивании белка полосы 3 в фосфолипидные везикулы на сколах появляются внутримембранные частицы, практически неотличимые от частиц, наблюдаемых в мембранах эритроцитов [1625, 1626]. Более того, при pH 5,5 частицы, наблюдаемые в мембране эритроцитов, агрегируют, причем эта агрегация осуществляется в результате взаимодействия белка полосы 3 с двумя другими белками, спектрином и актином. Последние являются компонентами цитоскелета, находящимися на внутренней поверхности эритроцитарной мембраны (см. гл. 4). Аналогичным образом ведет себя и реконструированная система, состоящая из белка полосы 3 и фосфатидилхолина, при этом агрегация частиц наблюдается в присутствии спектрина и актина при pH 5,5, но не при pH 7,6 [1625, 1626].



Рис. 1.6. Электронная микрофотография замороженных сколов везикул, реконструированных из яичного фосфатидилхолина и белка полосы 3 из эритроцитов человека [1625]. Видимые на фотографии частицы напоминают частицы, наблюдаемые в замороженных сколах мембраны эритроцитов.

Эти данные еще более упрочили представление о мембранных белках как о глобулярных частицах, свободно перемещающихся в плоскости мембраны. Интересно, что статичные микрофотографии препаратов, полученных методом замораживания—скалывания, помогли исследователям в изучении динамических свойств мембран. Как мы увидим (гл. 5), в мембранах есть много белков (в том числе белок полосы 3), которые не могут свободно плавать в «липидном море».

1.4. Выделение мембран

В течение последних трех десятилетий становилось все более очевидно, что огромное большинство клеточных функций осуществляется при непосредственном участии мембран. И растительные, и животные клетки разделены на отсеки (компарменты), причем многие цитоплазматические органеллы, как было показано в разд. 1.1, имеют мембранную природу. Кроме органелл, характерных для большинства клеток, имеются и специализированные мембранные системы, такие, как саркоплазматический ретикулум мышечных клеток, миелиновая оболочка периферических нервных волокон, тилакоидные мембраны хлоропластов и мембраны дисков в палочках сетчатки. У прокариотических организмов также имеются мембраны, хотя и не настолько развитые, как у эукариотических. Грамположитель-

ные бактерии, например *Bacillus subtilis*, имеют лишь цитоплазматическую мембрану, а грамотрицательные, такие, как *Escherichia coli*, — еще и наружную, расположенную поверх тонкой пептидогликановой клеточной стенки (см. разд. 4.4.2). В клетках прокариот обнаружены также некоторые специализированные органеллы (в частности, хроматофоры, содержащие фотосинтезирующий аппарат, у пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides*). Некоторые вирусы, патогенные для животных, например вирусы с оболочкой, имеют самую настоящую мембрану, причем такие мембраны оказались чрезвычайно интересными для изучения.

Исследование мембран, как правило, сопряжено с их очисткой, при этом для каждого типа мембран характерны свои условия препаративного выделения. Так, если предстоит исследовать плазматическую мембрану каких-либо клеток (например, гепатоцитов), то сначала необходимо выделить эти клетки из ткани. Затем нужно подобрать оптимальные условия разрушения клеток и отделения мембран, представляющих интерес, от других клеточных компонентов. Особого внимания заслуживают критерии чистоты выделенных мембран.

1.4.1. РАЗРУШЕНИЕ КЛЕТОК

Желательно выбирать такую методику, которая позволяет эффективно разрушить сами клетки при сохранении структуры мембран, подлежащих выделению. Для многих животных клеток можно использовать такую относительно мягкую процедуру, как гомогенизация в гомогенизаторах Даунса или Поттера—Элвехейма со стеклянными стенками и тефлоновым пестиком [436]. При этом клетки разрушаются за счет сдвиговых усилий, возникающих при продавливании суспензии через узкий зазор между тефлоновым пестиком и стеклянной стенкой гомогенизатора. При такой обработке «срывается» плазматическая мембрана и разрушаются связи между различными органеллами при сохранении целостности самих органелл. С помощью такой процедуры можно также отделить друг от друга специализированные участки плазматической мембраны, например базолатеральную или апикальную области мембраны эпителиальных клеток. Желательно работать в условиях, когда целостность органелл сохраняется, чтобы свести к минимуму возможность высвобождения гидролитических ферментов (например, из лизосом) и облегчить последующие операции по разделению мембран.

Для разрушения клеток, имеющих стенку (таких, как бактерии, клетки грибов и растительные клетки), требуются более жесткие методы. Иногда перед разрушением клеток их сначала обрабатывают ферментами, расщепляющими компоненты клеточной стенки, чтобы облегчить ее последующее разрушение. Так, например, для разруше-

ния клеток *E. coli* используют обработку буфером трис-ЭДТА и лизоцимом [1102]. Более жесткие приемы предусматривают растирание клеток, обработку их ультразвуком и экстракцию. Растирание обычно проводят в присутствии различных абразивных материалов — песка, окиси алюминия или стеклянных шариков. Малые объемы материала можно растереть в ступке с помощью пестика, но для больших объемов следует использовать специальные механические приспособления. Бактериальные клетки часто разрушают с помощью ультразвука. Полагают, что в этом случае разрушение происходит под действием сдвиговых усилий, возникающих в результате кавитации. Такие же усилия возникают при продавливании суспензии клеток через небольшое отверстие, например при разрушении клеток с помощью пресса Френча. Существует много разновидностей перечисленных методов, и их выбор зависит от особенностей той мембранной системы, которая подлежит изучению.

Следует отметить, что получаемые при разрушении клеток мембранные фрагменты обычно спонтанно образуют везикулы. В качестве примера (см. [435]) можно привести 1) микросомы, получаемые из плазматической мембраны, эндоплазматического ретикулума или специализированных систем, таких, как саркоплазматическая мембрана; 2) субмитохондриальные частицы из внутренней митохондриальной мембраны; 3) синаптосомы, образующиеся при отрыве нервных окончаний в области синаптических контактов; 4) бактериальные мембранные везикулы (везикулы Кабака), образующиеся из плазматической мембраны *E. coli*. Везикулы образуются и из других мембранных систем, например из мембран аппарата Гольджи. Их размер в большинстве случаев сильно зависит от метода разрушения клеток. Это особенно важно, поскольку размеры везикул в значительной степени определяют скорость их седиментации при центрифугировании (см. следующий раздел) и их поведение на следующих стадиях очистки мембран. Некоторые мембраны не образуют везикул, в частности мембраны боковых поверхностей соприкасающихся друг с другом животных клеток (см. рис. 1.2). При разрушении таких клеток происходит отрыв пары смежных мембранных фрагментов, удерживаемых вместе областью контакта. Наличие таких контактов предотвращает замыкание фрагментов в везикулы, поэтому мембраны выделяются в виде пластин или лентообразных структур [402].

Большое значение при разрушении клеток имеет также правильный выбор среды. Например, чтобы сохранить замкнутость мембранных органелл, следует использовать такую среду, которая изотонична их внутреннему содержимому. Чаще всего для этого используют раствор сахарозы в концентрации 0,25—0,30 М. В ряде случаев лучше использовать сорбитол и маннитол [52]. Следует отметить, что сохранение изотоничности играет важную роль и на последующих стадиях препаративного выделения интактных органелл.

1.4.2. РАЗДЕЛЕНИЕ МЕМБРАН

В настоящее время для разделения мембран чаще всего применяют центрифугирование (см. дополнение 1.2; работы [1209, 1459]). Мембранные частицы можно разделить по скорости их седиментации или по плавучей плотности. Первый метод называется зональным центрифугированием, и разделение происходит в соответствии со значениями S , а второй — изопикническим центрифугированием, и разделение происходит в условиях равновесной плотности. На практике обычно применяют некий гибрид этих двух методов. На

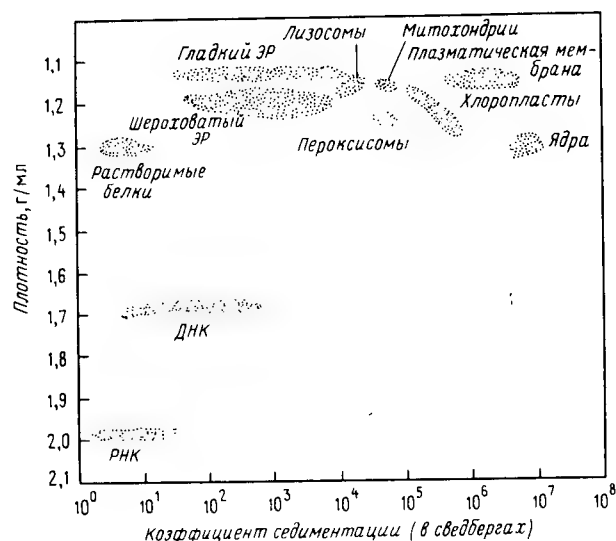


Рис. 1.7. Распределение субклеточных частиц на координатной плоскости « S — ρ » [1178]. По оси ординат отложены значения равновесной плотности, а по оси абсцисс — коэффициент седиментации в логарифмическом масштабе. Следует иметь в виду, что реальные значения зависят от среды, используемой для создания градиента. В случае РНК и ДНК использовался градиент CsCl.

рис. 1.7 показано положение некоторых субклеточных единиц на координатной плоскости « S — ρ ». По оси абсцисс отложены коэффициенты седиментации частиц, а по оси ординат — плотность. Принцип разделения по скорости седиментации можно легко уяснить, сравнив значения S для разных фракций. Например, ядра имеют относительно высокие значения S , т. е. скорость их седиментации значительно выше, чем у большинства других субклеточных органелл. Ядра можно избирательно осадить центрифугированием клеточного гомогената, при этом все другие органеллы останутся в надосадочной жидкости. В то же время гладкий и шероховатый эндоплазматический ретикулум не удастся разделить с помощью зонального центрифугирования.

Для выделения различных мембранных фракций из клеточного гомогената часто используют различия в их плотности. С этой целью проводят центрифугирование в градиенте плотности [1178]. Чаще всего для создания градиента плотности используют сахарозу, однако этот метод имеет серьезные недостатки. Чтобы получить плотность, требуемую для разделения различных мембранных фракций, необходимо готовить растворы с высокой концентрацией сахарозы, которые обладают высокой вязкостью и к тому же являются гипертоничными. Внесение субклеточных органелл в гипертоничный раствор сахарозы приводит к их дегидратации, а последующее доведение раствора до изотонических условий часто сопровождается лизисом и повреждением органелл [1020]. Другая проблема состоит в том, что многие мембранные органеллы проницаемы для сахарозы. Это также может привести к осмотическому разрушению органелл. Проникновение сахарозы в разделяемые мембранные органеллы может изменить их эффективную плотность [1140].

Чтобы решить эти проблемы, в последнее время все чаще используют другие среды для создания градиента плотности. Некоторые из этих сред перечислены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Физические свойства градиентных сред [1140]

	Концентрация, % (в/о)	Плотность, г/мл	Вязкость, сП	Осмоляльность, мОсм/кг H ₂ O
Сахароза	20	1,06	30	700
Метризамид	30	1,16	2	260
Фиколл	30	1,10	49	130
Перколл	26	1,13	10	10

1. **Фиколл.** Высокомолекулярный (молекулярная масса около 400 000) гидрофильный полимер сахарозы, который можно использовать для получения растворов с плотностью вплоть до 1,2 г/мл. Основное его преимущество состоит в низком осмотическом давлении растворов по сравнению с растворами с эквивалентной концентрацией сахарозы (в/о, %). Благодаря этому можно создавать растворы, изотоничные во всем диапазоне концентраций благодаря дополнительному включению в среду сахарозы (0,25 М) или приемлемых с физиологической точки зрения солей. Недостатками являются высокая вязкость получаемых растворов и существенно нелинейная зависимость вязкости и осмолярности от концентрации [1039].

2. *Метризамид*. Триодзамещенный бензамид глюкозы (мол.масса 789) [1039]. Растворы метризамиды имеют большую плотность, чем растворы фикола при тех же концентрациях. Основным преимуществом растворов метризамиды является их очень низкая вязкость, что позволяет ускорить разделение. 35%-ный раствор метризамиды имеет почти физиологическую осмолярность, так что большую часть операций в ходе разделения мембран можно проводить, не подвергая их действию гипертонических растворов. *Метризоат натрия* — родственное метризамиду соединение с близкими свойствами, с тем лишь отличием, что его раствор является изотоничным при концентрации около 20% (в/о). Метризоат натрия используют прежде всего для выделения интактных клеток. *Найкодент* также является производным триодбензойной кислоты, но имеет три гидрофильные боковые цепи. При центрифугировании он быстро образует свой собственный градиент плотности; используется для выделения субклеточных органелл [403] (Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, N.Y.).

3. *Перколл*. Коллоидная суспензия силикагеля, частички которого покрыты поливинилпирролидоном (ПВП) [1140]. Это покрытие ослабляет токсическое влияние силикагеля. Основным преимуществом перколлы является то, что он не проникает через биологические мембраны, а его растворы имеют низкую вязкость и низкую осмолярность. Вследствие большого размера частиц центрифугирование раствора перколлы при умеренных скоростях (например, при 30 000 g в течение 30 мин) приводит к формированию градиента плотности. Поэтому разделение обычно происходит очень быстро. Среда, используемая для центрифугирования, может быть изотоничной по всему объему благодаря включению в нее солей или сахарозы. Не составляет труда создать пологий градиент, что позволяет проводить весьма эффективное разделение мембранных фракций по их плавучей плотности [38, 914, 680].

4. *Сорбитол и маннитол*. Эти вещества иногда используют вместо сахарозы, поскольку они, судя по опубликованным данным, проникают через некоторые биологические мембраны хуже, чем сахароза [1179].

Заметим, что глицерол не используется для создания градиента плотности, поскольку с его помощью не удастся достичь достаточно высоких значений плотности. Соли щелочных металлов, например CsCl, используют только тогда, когда необходимы растворы с высокой плотностью. Но при этом следует иметь в виду, что в концентрациях, требуемых для создания равновесной плотности, эти соли часто оказывают повреждающее действие на мембранные органеллы.

Для выделения мембран из клеточных гомогенатов используют и другие методы, хотя и не так часто, как центрифугирование.

1. *Фазовое распределение* [14, 15]. В этом случае разделение мем-

бранных частиц происходит в соответствии с их поверхностными свойствами. С этой целью формируют два (или три) несмешивающихся слоя водных растворов различных водорастворимых полимеров. В качестве примера можно привести смеси полиэтиленгликоль—декстран и декстран—фиколл. Мембранные частицы разделяются в соответствии с их сродством к этим фазам. Последние можно подбирать так, чтобы разделять мембраны по их поверхностному заряду или гидрофобности.

2. *Непрерывный электрофорез в свободном потоке* [583, 584, 403]. В этом случае разделение частиц происходит в соответствии с их электрическим зарядом. Разделяемый препарат непрерывно вводят в тонкий слой буфера, стекающего по вертикальной стенке. При этом перпендикулярно направлению потока прикладывают электрическое поле. Таким образом, электрофоретическое разделение частиц происходит поперек стекающего буфера, который собирается на дне камеры в виде отдельных фракций.

3. *Аффинная адсорбция*. Разделение основано на биоспецифическом взаимодействии между мембранными компонентами и твердой фазой. С открытием моноклональных антител появилась возможность создания препаративных методик, основанных на использовании специфических антигенных компонентов для выделения мембран. Полученные антитела можно ковалентно присоединять к твердому носителю и с их помощью осуществлять специфическое связывание соответствующих мембран. Чаще всего этот метод используется для выделения мембранных белков [1613]. Одна из возникающих здесь проблем связана с подбором таких условий элюирования мембран, которые не вызывали бы денатурации белков.

4. *Метод, основанный на использовании микрогранул силикагеля* [553]. Обычно на долю плазматических мембран приходится не более 1% общей массы всех мембран эукариотических клеток. Поэтому выделение абсолютно чистых плазматических мембран сопряжено с большими трудностями. Один из подходов, который разработан специально для выделения плазматических мембран, основан на использовании катионизированных микрогранул силикагеля. Эти гранулы прочно адсорбируются на наружной поверхности плазматической мембраны интактных клеток (или протопластов), и фракция плазматических мембран, связанных с гранулами, легко отделяется в градиенте плотности сахарозы от других мембран за счет более высокой плотности гранул. Особенностью этого метода является то, что в получаемом препарате плазматическая мембрана своей внутренней поверхностью обращена в раствор.

Дополнение 1.2. Скорость седиментации и седиментационное равновесие

Скорость, с которой частицы оседают в поле центробежных сил, характеризуется коэффициентом седиментации S . Этот параметр является мерой стационарной скорости движения частицы в расчете на единицу приложенной силы:

$$S = \frac{dr/dt}{\omega^2 r}, \quad (1.1)$$

где S — коэффициент седиментации, обычно выражаемый в единицах Сведберга ($1 \text{ сведберг} = 10^{-13} \text{ с}$), r — расстояние от центра ротора, ω — угловая скорость ротора, равная произведению числа его оборотов на величину $(2\pi/60) \text{ с}^{-1}$.

Величина S определяется размером, формой и плотностью седиментирующей частицы, а также плотностью и вязкостью среды:

$$S = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{Nf} \approx \frac{M(1 - \rho_{\text{раств}}/\rho_{\text{част}})}{Nf}, \quad (1.2)$$

где M — молекулярная масса частицы, $\bar{V}$ — ее парциальный удельный объем, $\rho_{\text{част}}$ — плотность частицы, $\rho_{\text{раств}}$ — плотность раствора, N — число Авогадро, f — коэффициент трения, который характеризует трение при движении частицы в растворе.

Табличные значения коэффициента седиментации, $S_{20,w}$, приводятся для стандартных условий: вода при 20°C . Из приведенного уравнения видно, что скорость седиментации прямо пропорциональна массе частицы с поправкой на массу вытесняемого ею раствора и обратно пропорциональна сопротивлению движения частицы за счет трения (коэффициенту трения). Коэффициент трения зависит от размера и формы частицы. В случае сферических частиц $f = 6\pi\eta R$, где η — вязкость растворителя, R — радиус частицы. При прочих равных условиях любые частицы несферической формы будут седиментировать медленнее.

При *дифференциальном центрифугировании* разделение происходит в соответствии с различиями в коэффициенте S для разделяемых частиц. Если эти различия велики, то одни частицы оседают на дне центрифужной пробирки, а другие останутся в надосадочной жидкости. Различия в величине S могут быть обусловлены различиями в массе частиц, их форме или плотности либо, как это чаще всего бывает, различиями между всеми этими параметрами. С помощью дифференциального центрифугирования можно отделить мембраны от неразрушенных целых клеток и от ядер, а митохондрии — от микросом (рис. 1.7).

Если простого осаждения недостаточно для разделения мембран, то проводят *центрифугирование в градиенте плотности*. В этом случае плотность среды максимальна у дна центрифужной пробирки и минимальна в верхней ее части. Градиент плотности может иметь любую форму, но обычно он является либо линейным, либо ступенчатым. Градиент выполняет несколько функций. Он препятствует конвективному перемешиванию раствора в центрифужной пробирке; с помощью градиента можно разделять фракции мембран, которые седиментируют с разной скоростью, без достижения их полного осаждения; в градиенте плотности можно проводить изопикническое центрифугирование, при котором однотипные частицы концентрируются в той части пробирки, где $\rho_{\text{част}} = \rho_{\text{раств}}$, т. е. там, где их скорость седиментации становится равной нулю [см. уравнение (1.2)].

Отметим, что если плотность частицы выше, чем плотность среды, то она будет опускаться на дно ($S > 0$), а если меньше ($S < 0$), то всплывать. Этот последний процесс называется *флотацией* и часто используется при выделении мембран. Разделение мембран с помощью изопикнического центрифугирования основано на различии мембран по плотности, которая обычно определяется отношением белки/липиды. Например, шероховатый эндоплазматический ретикулум с мембраносвязанными полисомами обладает большей плотностью, чем гладкий эндоплазматический ретикулум. Легко разделяются таким способом наружная и внутренняя мембраны грамотрицательных бактерий, обладающие разной плотностью из-за различий в их составе.

Часто методику очистки мембран приходится оптимизировать эмпирически и нередко используют разделение как по величине S , так и по плотности мембранных частиц. В определенном градиенте плотности одни частицы достигают состояния равновесия (т. е. находятся в изопикнических условиях), а другие не достигают равновесной зоны до конца центрифугирования.

1.4.3. КРИТЕРИИ ЧИСТОТЫ МЕМБРАННЫХ ФРАКЦИЙ

Пожалуй, наиболее объективным критерием чистоты выделенной мембранной фракции является присутствие в ней какого-либо уникального компонента, который содержится только в этой мембране или является в ней преобладающим. Обычно такими компонентами служат ферменты, которые в данном случае называют маркерами. Список маркерных ферментов, которые используются для контроля чистоты мембранных фракций, приведен в табл. 1.2. При определении активности фермента следует принимать во внимание, что он может находиться в латентной форме, например благодаря тому, что локализуется на внутренней поверхности выделяемых мембран-

Таблица 1.2. Маркеры, используемые для контроля чистоты мембранных фракций, выделяемых из клеток млекопитающих ¹⁾

Мембранная фракция	Маркерный фермент
Плазматические мембраны	5'-Нуклеотидаза Щелочная фосфоэстераза Na ⁺ /K ⁺ -АТРаза (базолатеральная мембрана эпителиальных клеток) Аденилатциклаза (базальная мембрана гепатоцитов) Аминопептидаза (мембрана щеточной каемки эпителия)
Митохондрии (внутренняя мембрана)	Цитохром с-оксидаза Сукцинат—цитохром с-оксидоредуктаза
Митохондрии (наружная мембрана)	Моноаминоксидаза
Лизосомы	Кислая фосфатаза β -Галактозидаза
Пероксисомы	Каталаза Уратоксидаза
Мембраны аппарата Гольджи	Оксидаза D-аминокислот Галактозилтрансфераза (см. рис. 10.4)
Эндоплазматический ретикулум	Глюкозо-6-фосфатаза Холинфосфотрансфераза NADPH—цитохром с-оксидоредуктаза
Цитозоль	Лактатдегидрогеназа

¹⁾ Из работ [436, 698, 404].

ных везикул. Другие проблемы, связанные с оценкой чистоты выделенных мембран, рассмотрены в обзоре [436]. Следует отметить, что рекомендуемые методы в большинстве случаев достаточно хорошо отработаны и стандартизованы.

В ряде случаев более удобными мембранными маркерами являются не ферменты, а специфические рецепторы лектинов, гормонов, токсинов или антител. Если изучаемые системы хорошо охарактеризованы, то о чистоте мембранной фракции можно судить по ее белковому составу, определяемому с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Например, наружная мембрана грамотрицательных бактерий имеет

характерный набор полипептидов, которых нет в цитоплазматической мембране [885]. К другим критериям, по которым можно судить о чистоте мембран, относятся их морфология, выявляемая с помощью электронной микроскопии, и особенности химического состава. Например, фракции, представляющие плазматическую мембрану, аппарат Гольджи или митохондрии, можно идентифицировать по их морфологии. В некоторых случаях препарат характеризуют по содержанию в нем холестерина. Например, в мембранах митохондрии содержится гораздо меньше холестерина, чем в мембранах аппарата Гольджи и плазматических мембранах.

1.5. Состав мембран

Основными компонентами мембран являются белки и липиды. На долю углеводов может приходиться около 10% массы мембран, при этом они всегда входят в состав гликолипидов или гликопротеинов. Соотношение между белками и липидами в мембранах значи-

Таблица 1.3. Фосфолипидный состав субклеточных мембран печени крысы ¹⁾

	Доля от суммарного количества фосфолипидов, %					
	митохондрии	микро-сомы	лизосомы	плазматическая мембрана	ядерная мембрана	мембраны аппарата Гольджи
Кардиолипид	18	1	1	1	4	1
Фосфатидилэтаноламин	35	22	14	23	13	20
Фосфатидилхолин	40	58	40	39	55	50
Фосфатидилинозитол	5	10	5	8	10	12
Фосфатидилсерин	1	2	2	9	3	6
Фосфатидная кислота	—	1	1	1	2	< 1
Лизофосфолипиды ²⁾	1	11	7	2	3	3
Сфингомиелин	1	1	20	16	3	8
Фосфолипиды (мг/мг белка)	0,175	0,374	0,156	0,672	0,500	0,825
Холестерол (мг/мг белка)	0,003	0,014	0,038	0,128	0,038	0,078

¹⁾ По данным работы [284]. Дополнительные данные по липидному составу можно найти в работе [1570]. Состав эндосом, как известно, такой же, как и плазматических мембран [404].

²⁾ К данным о высоком содержании лизофосфолипидов следует относиться с осторожностью, поскольку это может быть результатом деградации в процессе выделения мембранных препаратов.

Таблица 1.4. Белковый и липидный состав некоторых мембран животных и бактериальных клеток. Л/Б — отношение липид/белок (по массе сухого вещества)¹⁾

Мембраны	Основные белки	Л/Б (в/в)	Основные липиды
Миелин (человек)	Основной белок Липофилин (протеолипид)	3—4	ФХ 10% ФЭ 20% ФС 8,5% СМ 8,5% Ганглиозиды 26% Холестерол 27%
Мембраны дисков (бык)	Родопсин	1	ФХ 41% ФЭ 39% ФС 13% Следы холестерина
Эритроциты (человек)	Белок полосы 3 Гликофорин Спектрин Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	0,75	ФХ 25% ФЭ 22% ФС 10% СМ 17% Холестерол 25%
Плазматическая мембрана ректальной железы (акула)	Na ⁺ /K ⁺ -АТРаза (1)		ФХ 50,4% ФЭ 35,5% ФС 8,4% ФИ 0,5% СМ 5,7% Холестерол
Мембраны холин-ергического рецептора (<i>Torpedo marmorata</i>)	Ацетилхолиновый рецептор	0,7—0,5	ФХ 24% ФЭ 23% ФС 9,6% Холестерол 40%
Саркоплазматический ретикулум (кролик)	Ca ²⁺ -АТРаза	0,66—0,7	ФХ 66% ФЭ 12,6% ФИ 8,1% Холестерол 10%
<i>E. coli</i> (внутренняя мембрана)		0,4	ФЭ 74% ФГ 19% КЛ 3%
Пурпурная мембрана (<i>Halobacterium halobium</i>)	Бактериородопсин	0,2	Фосфатидилглицеро-фосфат 52% Гликолипиды 30% Нейтральные липиды 6%

¹⁾ Основные белки этих мембран хорошо изучены и будут рассмотрены в других разделах этой книги. Используемые сокращения: ФХ — фосфатидилхолин, ФЭ — фосфатидилэтанолламин, ФС — фосфатидилсерин, СМ — сфингомиелин, ФИ — фосфатидилинозитол, ФГ — фосфатидил-глицерол, КЛ — кардиолипин. По данным работы [330].

тельно варьирует — от 20% (по массе сухого вещества) белка в миелине до 80% в митохондриях. В табл. 1.3 и 1.4 обобщены данные по составу ряда мембран. Плотность мембран прямо пропорциональна содержанию в них белка. Судя по данным изопикнического центрифугирования, чем выше содержание белка в мембране, тем больше ее плотность.

Белковый состав мембраны зависит в какой-то степени от метода ее выделения. Некоторые белки непрочно связаны с мембраной и легко удаляются при промывании ее растворами с высокой или, напротив, с низкой ионной силой, щелочными растворами или растворами, содержащими хелатирующие агенты типа ЭДТА. Бывают и случаи, когда трудно сказать, является ли белок мембранным или цитоплазматическим, случайно связавшимся с мембраной в ходе ее выделения.

1.5.1. МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ

Наиболее поражает в мембранных липидах их огромное разнообразие. Причины этого пока не ясны, хотя становится все более очевидно, что, по-видимому, связано это с тем разнообразием функций, которые липиды выполняют в мембранах (разд. 1.5.2). Но, конечно, главная функция мембранных липидов состоит в том, что они формируют бислойный матрикс, с которым взаимодействуют белки. Основные классы липидов представлены на рис. 1.8; их краткое описание дано ниже.

Глицерофосфолипиды

Это наиболее распространенные липиды. Одна из гидроксильных групп глицерола связана с полярной группировкой, содержащей фосфат, а две другие — с гидрофобными остатками. Номенклатура глицеридов основана на системе стереоспецифической нумерации (*sn*-система). Если глицерол изобразить в проекции Фишера, так что центральная группа будет расположена слева, то атомы углерода будут нумероваться так, как показано на рис. 1.9. В этом случае в название глицерофосфолипида вводят приставку *sn* для обозначения положения заместителя (например, *sn*-3-положение). В литературе встречается несколько систем стереохимических обозначений: *sn*, *D/L* и *R/S*. На рис. 1.9 представлена стереохимия атома С-2 в этих трех системах [604]. Природные фосфолипиды, как правило, имеют *R*(или *D*)-конфигурацию.

У большинства фосфоглицеридов фосфатная группа находится в *sn*-3-положении глицерола; она обычно связана с какой-либо из групп (холиновой, этаноламиновой, *мио*-инозитольной, сериновой и глицерольной), представленных на рис. 1.10.

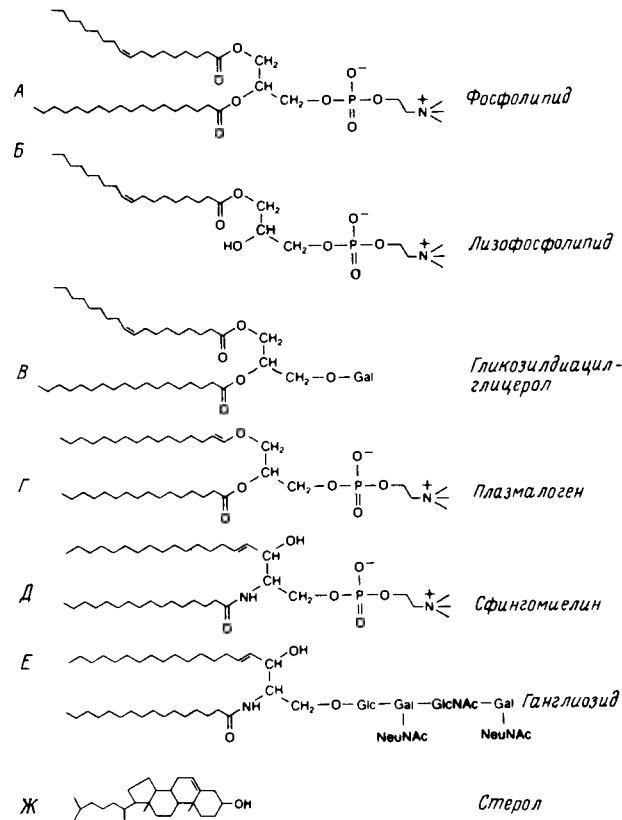


Рис. 1.8. Структурные формулы некоторых классов мембранных липидов [658]. Структуры представлены так, чтобы подчеркнуть амфифильную природу липидов, при этом неполярные группы расположены слева, а полярные головки — справа. Обозначения: Gal — галактоза, Glc — глюкоза, NeuNAc — N-ацетилнейраминная кислота (сиаловая кислота), GlcNAc — N-ацетилглюкозамин.

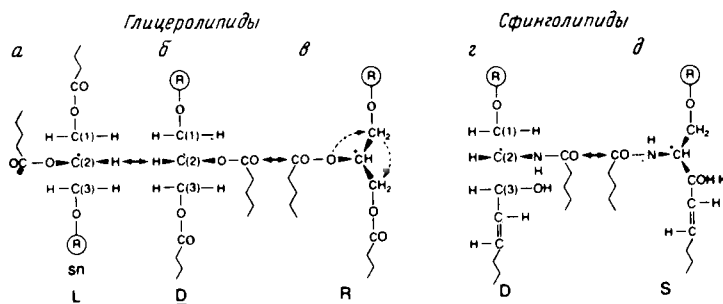


Рис. 1.9. Стереохимическая номенклатура глицероллипидов и сфинголипидов [604]. Обозначения R/S, D/L и *sn* приведены для положения C(2).

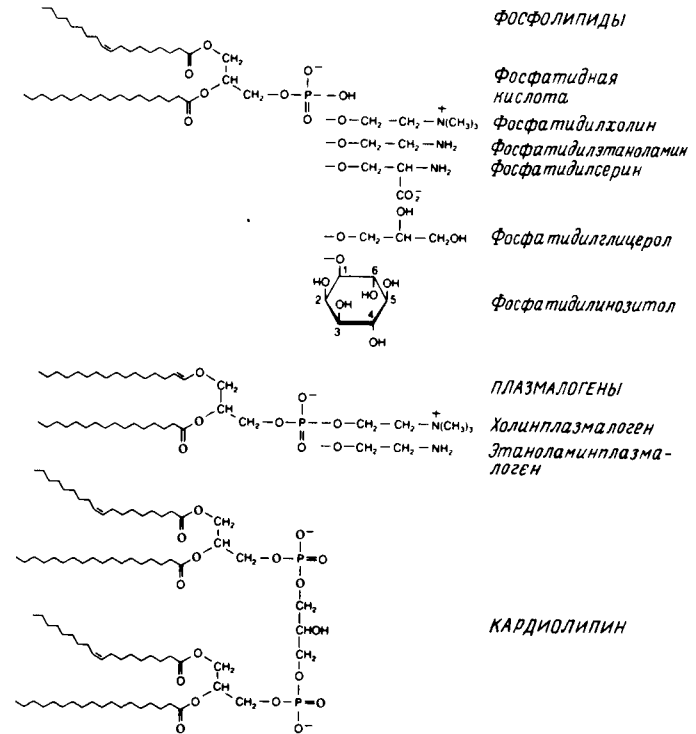


Рис. 1.10. Структурные формулы мембранных липидов, иллюстрирующие разнообразие полярных головок. При нейтральных pH аминогруппа остатка этаноламина протонирована.

Длинные углеводородные цепи, находящиеся в положениях *sn*-1 и *sn*-2, могут присоединяться за счет сложноэфирной и простой эфирной связей. Эти цепи значительно различаются по длине, разветвленности и степени ненасыщенности.

1. **1,2-диацилфосфоглицериды или фосфолипиды.** Эти липиды, являющиеся сложными эфирами жирных кислот и глицерола, широко представлены во многих мембранах эукариотических и прокариотических клеток, за исключением архебактерий [1296]. Фосфатидилхолин является основным компонентом мембран животных клеток, а фосфатидилэтаноламин — это нередко основной липид бактериальных мембран. В табл. 1.5 представлен ряд жирных кислот, наиболее часто встречающихся в составе фосфолипидов, а в табл. 1.6 приведен жирнокислотный состав клеточных мембран печени крысы.

Таблица 1.5. Некоторые жирные кислоты, обычно встречающиеся в мембранных липидах

Тривиальное название	Длина цепи, степень ненасыщенности
Лауриновая кислота	12:0
Миристиновая кислота	14:0
Пальмитиновая кислота	16:0
Пальмитоленовая кислота	16:1 (9-цис)
Стеариновая кислота	18:0
Олеиновая кислота	18:1 (9-цис)
Вакценовая кислота	18:1 (11-цис)
Линолевая кислота	18:2 (9-цис, 12-цис)
γ -Линоленовая кислота	18:3 (6-цис, 9-цис, 12-цис)
α -Линоленовая кислота	18:3 (9-цис, 12-цис, 15-цис)
Арахидиновая кислота	20:0
Бегеновая кислота	22:0
Арахидоновая кислота	20:4 (5-цис, 8-цис, 11-цис, 14-цис)

Жирные кислоты почти всегда содержат четное число атомов углерода в пределах от 14 до 24. Наиболее распространены кислоты C16, C18 и C20. Степень ненасыщенности может быть разной, но чаще всего встречаются ненасыщенные кислоты 18:1, 18:2, 18:3 и 20:4. Здесь первое число обозначает длину ацильной цепи, а второе указывает на число содержащихся в ней двойных связей. Почти все природные кислоты характеризуются *цис*-конфигурацией двойных связей. Цепь в такой конфигурации имеет излом, что нарушает упаковку липидных молекул в бислой (см. гл. 2). В составе молекул многих фосфолипидов имеется одна насыщенная и одна ненасыщенная цепи. В случае животных клеток ненасыщенные цепи обычно находятся в *sn*-2-положении глицерола. Такое же распределение цепей характерно и для фосфолипидов клеток *E. coli* (см. рис. 10.16). Двойные связи в полиненасыщенных цепях обычно являются сопряженными. В фосфолипидах некоторых бактериальных мембран обнаружены разветвленные цепи, а также цепи, содержащие циклы (например, циклопропан), и гидроксильные группы в β -положении. На рис. 1.11 показана структура некоторых из этих кислот [1262].

2. У архебактерий глицерофосфолипиды имеют обращенную стереохимическую конфигурацию, при которой фосфорильные группы находятся в *sn*-1-положении глицерола [1296]. У многих бактерий этого вида гидрофобные компоненты представляют собой не сложные эфиры жирных кислот, а простые изопренильные эфиры глицерола [1296, 719, 1007, 307, 888] (рис. 1.11).

3. Кардиолипиды или дифосфатидилглицеролы (рис. 1.10). По сути это димерные формы фосфолипидов. Они содержатся в боль-

Таблица 1.6. Жирнокислотный состав некоторых мембран печени крысы ¹⁾

Мембранная фракция	Жирные кислоты, % (по массе)													
	14:	15:	16:	16:1	17:	18:	18:1	18:2	18:3	20:	20:1	20:2	20:3	20:4
Наружная мембрана	0,4	27,0	4,1	21,0	13,5	13,5							1,1	15,7
митохондрий														3,5
Внутренняя мембрана	0,3	27,1	3,6	18,0	16,2	15,8							1,0	18,5
митохондрий														3,8
Плазматическая мембрана	0,9	36,9		31,2	6,4	12,9	Следы	Следы						11,1
Гладкий ЭР	0,4	28,6	3,1	26,5	10,6	14,9							1,4	14,0
Щероховатый ЭР	0,5	22,7	3,6	22,0	11,1	16,1							1,8	19,7
Аппарат Гольджи	0,9	34,7		22,5	8,7	18,1	»	»						14,5

¹⁾ По данным работы [1570].

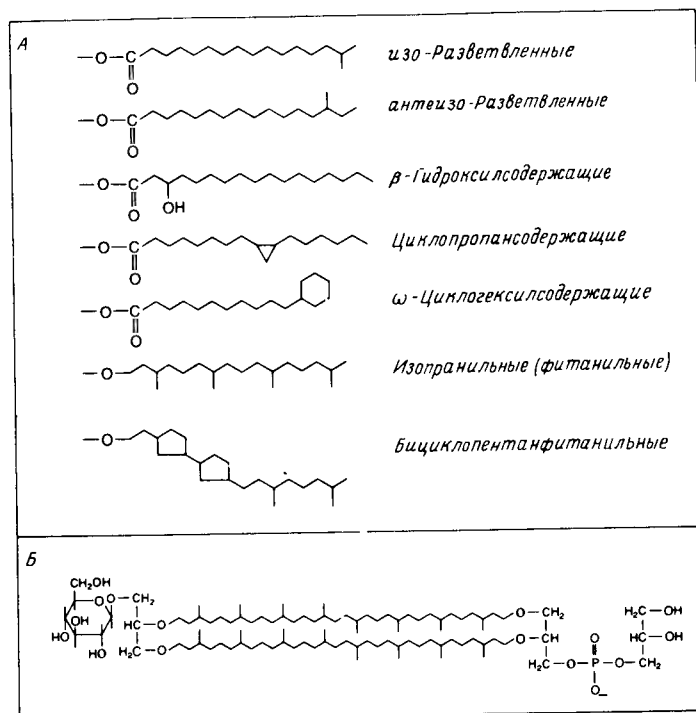


Рис. 1.11. А. Необычные ацильные и алкильные углеводородные цепи, встречающиеся в мембранных липидах бактерий [1262]. Многие из бактериальных штаммов, содержащих эти липиды (например, термофилы, ацидофилы и галофилы), адаптированы к экстремальным условиям [1262, 307, 888]. Б. Необычно простой тетраэфир, содержащий углеводородные цепочки длиной 40 атомов, который пронизывает мембрану клеток *Thermoplasma acidophilum* [111].

шом количестве во внутренней мембране митохондрий, в мембране хлоропластов и в некоторых бактериальных мембранах, но редко встречаются в других мембранах.

4. **Плазмалогены.** Это фосфоглицеролипиды, у которых одна из углеводородных цепей представляет собой простой виниловый эфир (рис. 1.9 и 1.10). Этаноламиновые плазмалогены широко представлены в миелине и в саркоплазматическом ретикулуме сердца [554].

Фосфосфинголипиды

Эти липиды имеют такие же полярные головки (например, фосфорилхолин), как и глицерофосфолипиды, но их гидрофобная часть

представлена церамидом. В плазматических мембранах животных клеток широко распространен сфингомиелин (церамид-1-фосфорилхолин) (рис. 1.8). Основными жирнокислотными компонентами в миелине являются кислоты 24:1 и 24:0. В мембранах растительных и бактериальных клеток фосфосфинголипиды встречаются редко. Кроме сфингомиелина известны и другие фосфосфинголипиды, например церамид-1-фосфорилэтанолламин, церамид-1-фосфоинозитол и церамид-1-фосфорилглицерол [590].

Гликоглицеролипиды [97]

Это полярные липиды, у которых в *sn*-3-положении глицерола находится углевод, присоединенный с помощью гликозидной связи, например галактоза. Гликоглицеролипиды широко представлены в мембранах хлоропластов, они обнаружены также в заметных количествах в сине-зеленых водорослях и бактериях. Моногалактозилдиацилглицерол (рис. 1.12) был назван «наиболее распространенным в природе полярным липидом», поскольку на его долю приходится половина всех липидов тилакоидной мембраны хлоропластов [533]. Для мембран грамположительных бактерий характерны гликоглице-

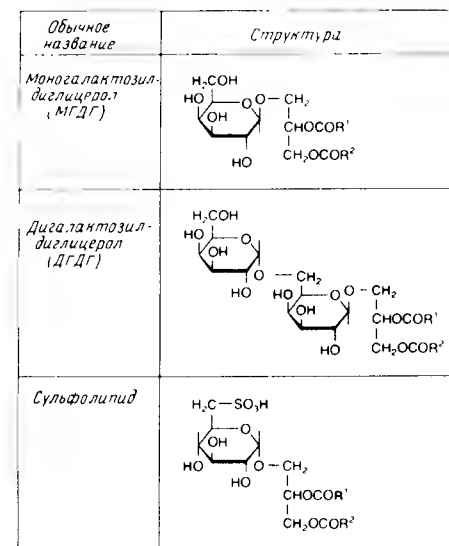


Рис. 1.12. Структурные формулы типичных гликоглицеролипидов. Обратите внимание, что в сульфолипиде имеется ковалентная связь между атомами С и S. R — углеводородные цепи. Эти липиды содержатся главным образом в листьях растений и водорослях.

ролипиды с большим разнообразием сахаров. Архебактерии также содержат такие липиды, но, как и в случае глицерофосфолипидов, их стереохимическая конфигурация является обращенной, с локализацией гликозидной связи в *sn*-1-положении глицерола [307, 888]. В мембранах животных клеток гликоглицеролипиды встречаются редко.

Гликофинголипиды [271]

Эти липиды содержат углеводы, присоединенные с помощью гликозидной связи к концевой гидроксильной группе церамида. Их

А Структура некоторых гликофинголипидов

Глюкоцереброзид	Cer — Glc
Лактозилцерамид	Cer — Glc — Gal
Глобозид	Cer — Glc — Gal — Gal — GalNAc
Сульфатид	Cer — Gal(3) — OSO ₃
Галактоцереброзид	Cer — Gal

Ганглиозиды

GM ₃	Cer — Glc — Gal — NeuNAc
GM ₂	Cer — Glc — Gal — GalNAc NeuNAc
GM ₁	Cer — Glc — Gal — GalNAc — Gal NeuNAc

Б. Детальная структура ганглиозида GM₁

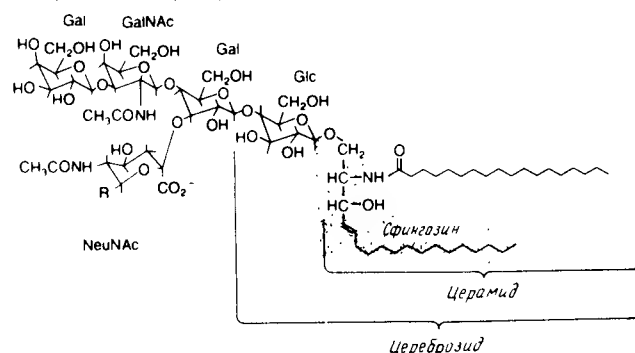


Рис. 1.13. Структура некоторых гликофинголипидов. А. Сокращенные обозначения ряда структур. Используемые сокращения: Cer — церамид, Glc — глюкоза, Gal — галактоза, NeuNAc — сialовая или N-ацетилнейраминная кислота, GalNAc — N-ацетилгалактозамин. Ганглиозид GM₃ называют также гематозидом, а ганглиозид GM₂ — ганглиозидом Тей-Сакса. Б. Более детальная структура ганглиозида GM₁, на которой указаны названия отдельных его элементов.

классифицируют в соответствии с размером углеводной части, которая может быть представлена всего лишь одним моносахаридным остатком, с одной стороны, и очень сложным углеводным полимером — с другой (рис. 1.13). Моногликозилцерамиды обычно называют цереброзидами. Ганглиозиды представляют собой класс анионных гликофинголипидов, которые содержат один или несколько остатков сialовой кислоты (N-ацетилнейраминной кислоты, NeuNAc), связанных с сахарными остатками церамидолигосахарида. Глобозидами называют нейтральные гликофинголипиды, которые не содержат остатков отрицательно заряженной сialовой кислоты.

Гликофинголипиды находятся на наружной поверхности плазматических мембран животных клеток; обычно они являются минорными компонентами, но иногда содержатся в значительных количествах (например, в плазматических мембранах эпителиальных клеток [849]). Моногалактозилцерамид — это один из основных компонентов миелиновой оболочки нервного волокна. В некоторых случаях гликофинголипиды локализуются не в плазматической мембране, а во внутриклеточных мембранах [1416].

Гликофинголипиды мембран эритроцитов несут антигены группы крови [494, 320]. В клетках аденокарциномы человека накапливаются необычные фукозиллированные гликофинголипиды, которые можно использовать для обнаружения этих клеток и контроля за развитием опухоли [573].

Стероиды

Эти липиды присутствуют во многих мембранах растений, животных и микробов. По-видимому, самым распространенным из стероидов является холестерол. Его молекула состоит из компактного, жесткого гидрофобного ядра, а полярной головкой является гидроксильная группа. Холестерол содержится в плазматических мембранах животных клеток, в лизосомах, эндосомах [404] и в мембранах аппарата Гольджи. Он составляет около 30% всей массы мембранных липидов во многих плазматических мембранах животных клеток. В высших растениях обнаружены другие стеролы, чаще всего ситостерол и стигмастерол. Растительные стеролы (фитостеролы) часто имеют еще одну боковую цепь в положении C-24 и/или двойную связь в положении C-22 (рис. 1.14). В мембранах дрожжей и дру-

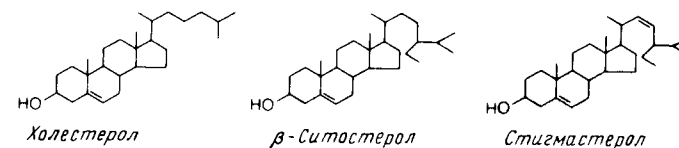


Рис. 1.14. Структурные формулы стеролов, присутствующих в мембранах эукариотических клеток.

гих эукариотических микроорганизмов часто содержится эргостерол [1181]. К классу стеролоподобных липидов относят также гопаиноиды, которые найдены в бактериях и некоторых растениях.

Минорные компоненты

В мембранах присутствуют также и другие липиды, которые можно отнести к разряду минорных компонентов вследствие их малого содержания в мембранах. Так, в мембранах обычно обнаруживаются, хотя и в очень малых количествах, свободные жирные кислоты и лизофосфолипиды. Пожалуй, исключением из этого правила являются мембраны хромаффинных гранул, которые, как известно [668], содержат необычно много свободных жирных кислот. Минорными компонентами мембран являются также моноацил- и диацилглицеролы. Диацилглицеролы выполняют важную функцию вторых посредников в передаче сигнала при активации клеток рядом биологически активных веществ. Эта система клеточного отклика на внешний стимул будет детально рассмотрена в гл. 9. В мембранах обычно присутствуют и полиизопреноидные липиды. К ним относятся убихиноны и менахиноны — компоненты цепи электронного транспорта в мембранах. Можно отметить также ундекапrenoл и долихол, которые являются липидными переносчиками промежуточных продуктов соответственно при биосинтезе клеточной стенки у прокариот и при биосинтезе гликопротеинов в аппарате Гольджи эукариот. Длина молекул этих липидов в вытянутом состоянии значительно превышает толщину бислоя, поэтому неизвестно, как эти молекулы в нем расположены. Неясно также, почему липидными переносчиками служат именно полиизопреноидные структуры.

1.5.2. МНОГООБРАЗИЕ ФУНКЦИЙ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ

Совершенно очевидно, что липидный состав различных мембран не является случайным [1257], однако удовлетворительного объяснения этому феномену не найдено. Любая конкретная мембрана может содержать более ста разных типов липидных молекул. Почему их так много и почему каждая мембрана имеет уникальный липидный состав? Пути биосинтеза мембранных липидов и механизмы их доставки к местам назначения обсуждаются в разд. 10.4. Становится все более очевидным, что липиды активно участвуют в процессах, протекающих в мембранах, однако причины их разнообразия неясны. Рассмотрим некоторые факторы, возможно, определяющие липидный состав мембраны.

1. Смесь липидов обязательно должна быть способна образовать стабильный бислой, в котором могли бы функционировать белки. Этот вопрос будет рассматриваться в следующей главе.

2. Некоторые липиды способствуют стабилизации сильно искривленных участков мембраны, образованию контакта между мембранами или связыванию определенных белков [303, 267, 272], поскольку форма этих молекул благоприятствует нужной упаковке бислоя на соответствующих участках мембраны. Полиморфизм мембранных липидов обсуждается в следующей главе.

3. Некоторые липиды являются важными биорегуляторами. Наиболее изучена в этом отношении регуляторная роль производных фосфатидилинозитола в плазматических мембранах клеток эукариот (см. разд. 9.7.3).

4. Некоторые липиды участвуют в реакциях биосинтеза. Например, в клетках *E. coli* фосфатидилглицерол поставляет глицерофосфатный фрагмент при биосинтезе периплазматических олигосахаридов (см. разд. 10.4.3).

5. Отдельные липиды необходимы для поддержания оптимальной активности ряда ферментов. Этот вопрос рассматривается в гл. 6.

6. Ганглиозиды, как полагают, играют важную роль в регуляции роста клеток [1368], являются специфическими рецепторами в плазматической мембране [210] и ответственны за клеточную адгезию [812].

7. Специфические функции могут выполнять и другие липиды. К ним относятся полиизопреноиды (например, долихол, убихиноны, менахиноны и каротиноиды), а также фактор активации тромбоцитов [576].

Как было показано экспериментально, организмы часто могут выдерживать — причем без всяких последствий — существенные изменения липидного состава мембран. Например, с помощью генетической трансформации можно получить штаммы *E. coli*, в мембранах которых содержится 34% фосфатидной кислоты, обычно отсутствующей в штаммах дикого типа [1365] (см. рис. 10.16). Очевидно, тот липидный состав, который характерен для штаммов дикого типа, не является обязательным для выживания клеток, по крайней мере в условиях их выращивания в лаборатории.

1.5.3. МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Как видно из табл. 1.3 и 1.4, мембраны содержат от 20 до 80% (по весу) белка. Как правило, именно белки ответственны за функциональную активность мембран. К ним относятся разнообразные ферменты, транспортные белки, рецепторы, каналы, поры и т. д., которые обеспечивают уникальность функций каждой мембраны. Первые успехи в изучении мембранных белков были достигнуты тогда, когда биохимики научились использовать детергенты для выделения мембранных белков в функционально активной форме. Это

были работы по изучению ферментных комплексов внутренней мембраны митохондрий. Значительным шагом вперед осознание того, что мембранные белки имеют не исключительно β -складчатую структуру, как предполагалось в модели «элементарной мембраны» Дэвсона—Даниелли—Робертсона, а содержат достаточно много α -спиралей. Важное значение имел также вывод о том, что мембранные белки могут глубоко проникать в липидный бислой или даже пронизывать его и что их стабилизация осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий. Эти термодинамические представления существенно обогатили принцип «гидрофобных сил», предложенный для объяснения структуры белков и предполагавший существование неполярной, гидрофобной области внутри белковой глобулы и полярных, гидрофильных участков, контактирующих с водной средой.

По мере совершенствования методов очистки удавалось получать в изолированном виде все большее число мембранных белков. Определение первичной структуры большинства из них было затруднено из-за плохой растворимости в воде как самих белков, так и получаемых из них гидрофобных пептидов. В середине 1970-х гг. эта проблема была решена для двух мембранных белков — гликофорина и цитохрома b_5 , что позволило установить основной принцип структурной организации интегральных белков. В аминокислотной последовательности гликофорина — сиалогликопротеина из мембраны эритроцитов — был обнаружен короткий участок, состоящий из 23 неполярных аминокислот и расположенный примерно в середине цепи [1461] (см. рис. 3.17). Данные топологических и других исследований показали, что молекула гликофорина полностью пронизывает мембрану, причем погруженный в мембрану гидрофобный участок имеет α -спиральную конфигурацию [475]. Так вошла в жизнь новая, теперь уже общепризнанная концепция о наличии в мембранных белках α -спиральных доменов, пронизывающих мембрану. Эта концепция была полностью подтверждена при изучении трансмембранных белков с помощью методов, которые позволяют получить максимально возможное в наше время разрешение. Судя по результатам реконструкции электронно-микроскопических изображений препаратов бактериородопсина из пурпурной мембраны *Halobacterium halobium* [619] и по данным рентгеноструктурного исследования фотосинтетических реакционных центров бактерий [319], эти белки содержат несколько α -спиральных участков, последовательно пересекающих бислой (гл. 3).

Другой вариант расположения полипептидной цепи в мембране был обнаружен при изучении аминокислотной последовательности интактной формы микросомного цитохрома b_5 . Было показано, что этот белок содержит относительно короткий участок вблизи карбоксильного конца, состоящий из гидрофобных аминокислот [1113, 437] (см. разд. 4.2.2). Этот «гидрофобный якорь» можно было удалить

с помощью протеолиза, причем гемсвязывающий домен высвобождался в водорастворимой форме. Локализованный в мембране гидрофобный домен, или «якорь», стал еще одним характерным элементом структуры мембранных белков.

В основе современных представлений о структуре мембранных белков лежит идея о том, что их полипептидная цепь уложена так, чтобы образовалась неполярная, гидрофобная поверхность, контактирующая с неполярной областью липидного бислоя. Полярные или заряженные домены белковой молекулы могут взаимодействовать с полярными головками липидов на поверхности бислоя. Многие мембранные белки являются трансмембранными и пронизывают бислой. Некоторые белки, по-видимому, связаны с мембраной лишь за счет их взаимодействия с другими белками.

Мембранные белки обычно связываются с мембраной с помощью нековалентных взаимодействий — гидрофобных или электростатических сил (см. гл. 3). Однако есть мембранные белки, которые связаны с липидами ковалентно (см. разд. 3.8). Такие примеры пока немногочисленны, но их появляется все больше. Многие белки плазматических мембран растительных и животных клеток (например, гликофорин) относятся к классу гликопротеинов. Углеводные остатки этих белков всегда находятся с наружной стороны плазматической мембраны.

Обычно мембранные белки подразделяют на наружные (периферические) и внутренние (интегральные). При этом критерием служит степень жесткости обработки, необходимой для извлечения этих белков из мембраны. Периферические белки высвобождаются при промывании мембран буферными растворами с низкой ионной силой, буферными растворами с низким или, наоборот, высоким значением pH и в присутствии хелатирующих агентов (например, ЭДТА), связывающих двухвалентные катионы [1438]. Как полагают, такие белки связаны с поверхностью мембраны за счет слабых электростатических взаимодействий с полярными головками липидных молекул либо с молекулами других белков. Часто бывает нелегко отличить периферические мембранные белки от белков, связавшихся с мембраной в процессе ее выделения. При обработке мембранного препарата буфером с низкой ионной силой в раствор переходит около 30% белков, связанных с мембраной эритроцитов [922, 1348]. При несколько более жесткой обработке хаотропными агентами (например, ClO_4^- или SCN^-) высвобождаются периферические белки [1438]. В ряде случаев эти агенты оказывают влияние достаточно сильное, чтобы разрушить белок-белковые взаимодействия, хотя денатурации белков при этом не происходит. Действие хаотропных агентов, «нарушающих структуру воды», обусловлено главным образом ослаблением гидрофобных взаимодействий между компонентами мембраны [278] (см. гл. 2).

Для высвобождения интегральных мембранных белков необходимо использовать детергенты или даже органические растворители. Детергенты разрушают липидный бислой и, как полагают, связываются с гидрофобными участками мембранных белков, контактирующими с гидрофобной областью бислоя. Для того чтобы сохранить интегральные мембранные белки в растворенном моодисперсном состоянии, в растворе постоянно должны присутствовать детергенты. При удалении детергентов неизбежно происходят агрегация белков и их последующее осаждение. Дальнейшая информация о взаимодействиях между белками и детергентами, а также о структуре и свойствах мембранных белков содержится в гл. 3.

1.6. Резюме

Методы дифракции рентгеновских лучей и электронной микроскопии сыграли историческую роль в развитии мембранологии и внесли решающий вклад в современные представления о биологических мембранах. Сегодня не вызывает сомнений, что липидный бислой образует структурную основу практически всех биологических мембран и что их функциональное многообразие основано именно на этом структурном единстве различных мембранных систем. Каждая отдельно взятая мембрана содержит большое число различающихся по своим химическим свойствам липидов. Причины этого разнообразия неясны, хотя появляется все больше данных об уникальных биологических функциях отдельных липидов. На долю белков приходится от 20 до 80% массы мембран. Многие из этих белков полностью пронизывают липидный бислой, и их удается сольбилизовать только с помощью детергентов. Другие мембранные белки, называемые периферическими, легко извлекаются из мембраны с помощью буферных растворов с изменяющимися рН или ионной силой либо при удалении двухвалентных катионов с помощью хелатирующих агентов.

В настоящее время разработаны методы выделения и характеристики индивидуальных мембран из клеток прокариот, из животных и в меньшей степени из растительных клеток. Разделение чаще всего основано на различиях в размере и плотности мембранных частиц, содержащихся в гомогенате разрушенных клеток. Можно также использовать различия в поверхностных свойствах мембран или в их электрофоретическом поведении. Выделение и очистка мембран — первый и обязательный этап в их биохимическом исследовании.

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ

В предыдущей главе вы вкратце рассмотрели историю развития концепции липидного бислоя как структурной основы биологических мембран. Прежде чем перейти к самим биологическим мембранам, следует детально проанализировать структуру липидного бислоя, а также термодинамические принципы, определяющие его стабильность. Кроме того, некоторые липиды самопроизвольно образуют структуры, не имеющие бислоевой организации (такие, например, как инвертированная гексагональная фаза H_{II}), и эти липиды, как полагают, играют особую роль в мембранах [303, 267]. В этой главе мы рассмотрим структуру и термодинамику водно-липидных систем, уделяя основное внимание тем характеристикам, которые позволяют глубже понять свойства биологических мембран.

2.1. Жидкие кристаллы [6]

С помощью рентгеноструктурного анализа установлена с высоким разрешением пространственная структура ряда мембранных липидов. К ним относится лизофосфатидилхолин [605], димиристоилфосфатидная кислота [594], димиристоилфосфатидилхолин [1133], дилауроилфосфатидилэтаноламин [636], димиристоилфосфатилглицерол [1126] и цереброзид [1125]. Кристаллы этих липидов содержат очень мало воды, однако пространственная структура липидов в них оказалась подобна той, которую они имеют в полностью гидратированном состоянии. На рис. 2.1 представлена пространственная структура некоторых из этих мембранных липидов в кристаллах. Атомы углерода остатка глицерола и соответствующие атомы сфингозина выделены черным цветом. На рис. 2.2 указаны некоторые структурные параметры, используемые для описания конформации липидов.

Рассмотрим кристаллическую структуру дилауроилфосфатидилэтаноламина (рис. 2.1, А) и укажем наиболее характерные ее особенности.

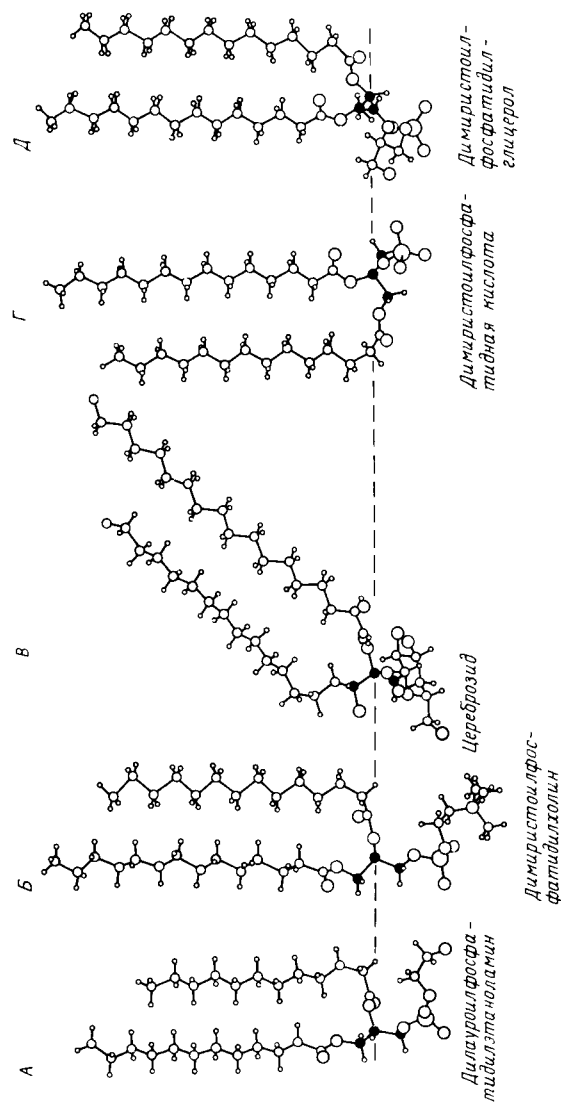


Рис. 2.1. Структура пяти мембранных липидов, установленная с помощью рентгеноструктурного анализа. Черные точки — три атома углеродного скелета глицерола и сфингозина. Обратите внимание, что в структурах А, Б и В глицерольный и сфингозиновый остатки имеют одинаковую конформацию, а в структурах Г и Д — разную. Воспроизведено из работ [604, 636] (А), [1125] (Б), [1125] (В), [594] (Г), [1126] (Д). Рисунки любезно предоставлены д-ром I. Pascher.

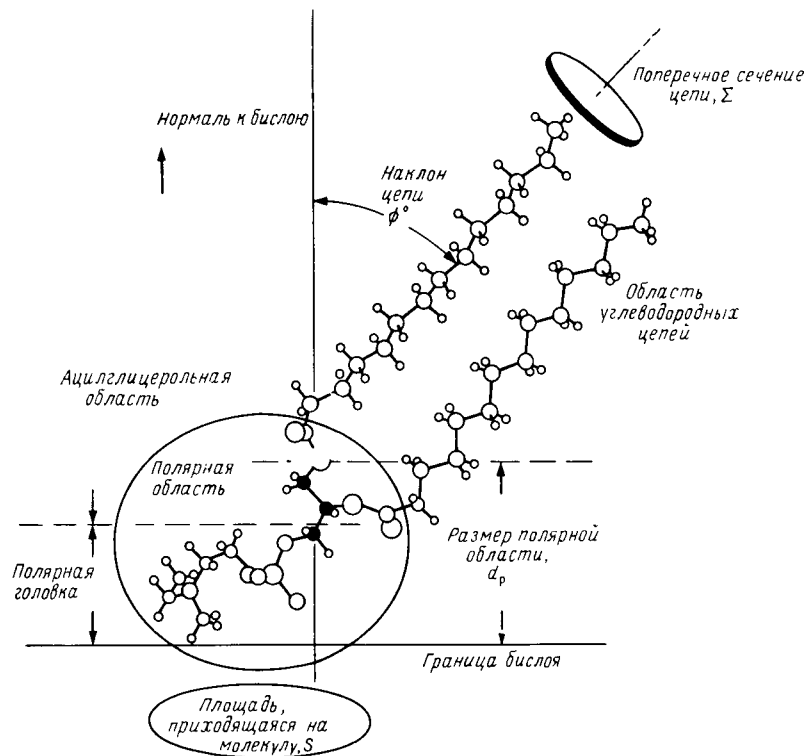


Рис. 2.2. Схематическое изображение молекулы фосфатидилхолина с указанием различных участков молекулы [604]. Обратите внимание, что поперечное сечение углеводородной цепи Σ перпендикулярно оси цепи. Поперечное сечение, параллельное плоскости мембраны, будет значительно больше, поскольку цепь наклонена.

1. Площадь, приходящаяся на молекулу (S , см. рис. 2.2), составляет $39 \text{ \AA}^2$.
2. Полярная головка в целом ориентирована параллельно плоскости бислоя. При этом аминогруппа образует водородную связь с незтерифицированными атомами кислорода фосфатной группы соседней молекулы. Остаток глицерола ориентирован перпендикулярно плоскости бислоя.
3. Жирнокислотная цепь $sn-2$ сначала идет параллельно поверхности бислоя, а после второго углеродного атома направляется в глубь бислоя.
4. Ацильные цепи расположены перпендикулярно поверхности бислоя и, за исключением начального участка $sn-2$ жирнокислотной

цепи, максимально вытянуты, т. е. имеют полностью-*транс*-конфигурацию.

Кристаллические структуры фосфатидилхолина и цереброзида во многом сходны со структурой фосфатидилэтаноламина, хотя и

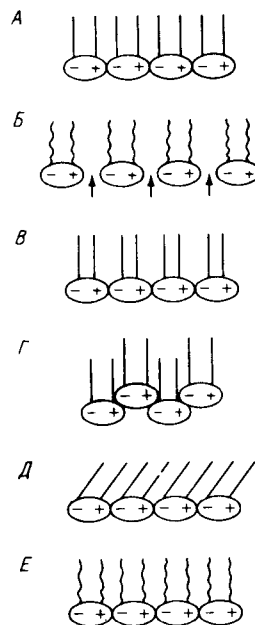


Рис. 2.3. Схематическое представление зависимости упаковки липидных молекул от соотношения между поперечным сечением полярной головки и ацильных цепей (S и 2Σ ; см. рис. 2.2) [604]. Эти рисунки иллюстрируют поведение фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина. *А.* Кристалл фосфатидилэтаноламина; стерические ограничения, налагаемые на размещение полярных головок и двух ацильных цепей, одинаковы. *Б.* Фосфатидилэтаноламин в ламеллярной жидкокристаллической фазе; увеличение площади, приходящейся на молекулу, приводит к нарушению упорядоченности в расположении полярных головок. Стабилизация структуры происходит только в том случае, если вода или другие полярные молекулы заполняют пустоты между соседними липидными молекулами. *В.* Гипотетическое расположение молекул фосфатидилхолина, показывающее, что площадь, занимаемая полярной головкой ($50 \text{ \AA}^2$), гораздо больше площади, необходимой для размещения ацильных цепей ($38 \text{ \AA}^2$). Это приводит к некоторой перегруппировке молекул. *Г.* Один из способов уплотнения фосфатидилхолиновых молекул, наблюдаемых в кристаллах, состоит в смещении полярных головок, в результате которого они перекрывают друг друга. *Д.* Более плотная упаковка, наблюдаемая в ламеллярной гелевой фазе фосфатидилхолина, осуществляется благодаря наклону цепей и увеличению их поперечного сечения до $50 \text{ \AA}^2$. *Е.* Фосфатидилхолин в ламеллярной жидкокристаллической фазе; размеры полярных головок таковы, что нарушения их упаковки не происходит.

имеют ряд важных отличий. Наиболее значительное и явное из них состоит в наклоне ацильных цепей, сильно выраженном в случае цереброзида. Этот наклон связан с наличием стерических препятствий для упаковки молекул. Объемные полярные головки фосфатидилхолина и цереброзида не позволяют им упаковываться в сравнительно простые структуры, как в случае дилаурилфосфатидилэтаноламина. Площадь S , необходимая для размещения этих головок, превышает величину $39 \text{ \AA}^2$, приходящуюся на поперечное сечение ацильных цепей каждой молекулы (2Σ ; рис. 2.2). В случае цереброзида эта проблема решается за счет наклона ацильных цепей по отношению к плоскости бислоя. В результате существенно увеличивается площадь проекции поперечного сечения ацильных цепей на плоскость бислоя. На рис. 2.3 схематично показано, как благодаря наклону цепей сохраняется взаимодействие между цепями соседних молекул и обеспечивается размещение объемных полярных групп. Жирнокислотные цепи димиристоилфосфатидилхолина отклоняются от нормали к поверхности бислоя всего на 12° , тогда как в случае цереброзида это отклонение достигает 41° [1133]. Проблема упаковки объемных полярных групп диацилфосфатидилхолина может быть решена путем поочередного смещения соседних молекул вдоль нормали к бислою, как схематически показано на рис. 2.3, *Г*. Имеются убедительные данные и о значительном наклоне цепей в гелевой фазе полностью гидратированных липидных бислоев (см., например, работы [604, 1220], а также разд. 2.2). Это наглядный пример того, как простые стерические соображения, учитывающие «форму» липидных молекул (сопоставление S и 2Σ), оказываются весьма полезными при рассмотрении пространственной структуры липидов. Другие примеры будут описаны в разд. 2.3.4.

В кристаллах всех изученных липидов, за исключением фосфатидной кислоты, начальный участок *sn*-2-жирнокислотной цепи направлен параллельно поверхности бислоя. Об этой особенности расположения цепей свидетельствовали также результаты ЯМР-исследований фосфатидилэтаноламиновых и фосфатидилхолиновых бислоев, а также фосфолипидов в мембранах *E. coli* [487]. Физиологическая значимость этой структурной особенности неясна. Однако отмечалось, что в яичном фосфатидилхолине средняя длина *sn*-2-жирнокислотной цепи равна 18 углеродным атомам, а средняя длина *sn*-1-цепи — 16. По-видимому, это позволяет скомпенсировать излом жирнокислотной цепи во втором положении остатка глицерола так, что обе ацильные цепи оказываются погруженными в бислой на одну и ту же глубину.

Итак, можно отметить пять основных особенностей кристаллической структуры, которые важны при рассмотрении строения липидных бислоев.

1. Все изученные структуры имеют ламеллярную организацию

с таким же расположением полярных и неполярных групп, как и в бислое.

2. Некоторые липиды, например фосфатидилхолины и цереброзиды, имеют объемные полярные головки ($S > 2\Sigma$), из-за чего возникают затруднения при упаковке молекул. Соотношение между указанными молекулярными параметрами играет важную роль при упаковке мембранных липидов не только в кристаллах, но и в модельных мембранах, а также, вероятно, и в биологических мембранах.

3. Как правило, полярные головки липидных молекул расположены в плоскости бислоя, что способствует образованию межмолекулярных водородных связей.

4. Ацильные цепи (насыщенные) находятся в полностью-*транс*-конфигурации.

5. В большинстве случаев *sn*-2-жирнокислотные цепи начинают углубляться в бислой только после атома C-2.

Эти структурные особенности характерны и для ламеллярных систем, образуемых водно-липидными смесями (см. следующий раздел) в фазе геля (пп. 1, 2, 3, 4, 5) и/или в жидкокристаллической фазе (пп. 1, 3, 5). Изучение пространственного строения липидов в кристаллах имеет важное значение при рассмотрении конформационного состояния липидов в биологических мембранах.

2.2. Водно-липидные смеси

Смеси липидов с водой отличаются выраженным полиморфизмом. Даже индивидуальные очищенные липиды в гидратированном состоянии могут находиться в нескольких структурных модификациях. Какая из структур преобладает, зависит от таких параметров, как концентрация липида, температура, давление, ионная сила и pH. Особенно полезным при изучении типов структурной организации водно-липидных систем оказался метод дифракции рентгеновских лучей. При этом чаще всего варьируют концентрацию липида и температуру, а полученные данные представляют в виде фазовой диаграммы, показывающей, какую структуру система имеет в различных областях диаграммы «температура — концентрация». Наряду с дифракцией рентгеновских лучей для определения фазовых границ водно-липидных систем часто используют дифференциальную сканирующую калориметрию. Эти исследования проводят обычно при высоких концентрациях липида ($>40\%$, в/в), однако многие структуры, обнаруженные при таких условиях, образуются также в липидных дисперсиях при большом избытке воды.

Основные типы структурной организации водно-липидных систем [1334, 263] схематично представлены на рис. 2.4.

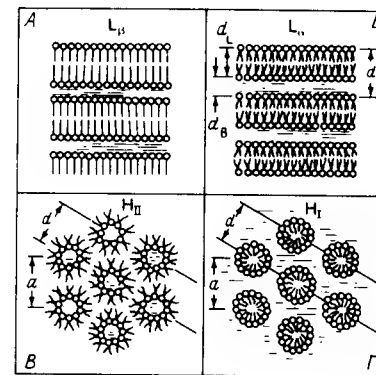


Рис. 2.4. Схематическое изображение различных фаз водно-липидных систем [34]. А. Ламеллярная гелевая фаза. Б. Ламеллярная жидкокристаллическая фаза. В. Гексагональная фаза типа II. Г. Гексагональная фаза типа I. Указаны различные параметры, которые можно измерить по данным дифракции рентгеновских лучей.

1. *Ламеллярная жидкокристаллическая фаза (L_α)*. Считают, что именно в этой фазе находится основная масса липидов в биологических мембранах. Как свидетельствуют данные дифракции рентгеновских лучей, для этой фазы характерно упорядоченное расположение слоистых структур при значительной неупорядоченности ацильных цепей.

2. *Ламеллярная гелевая фаза (L_β)*. Она образуется при низкой температуре теми липидами, которые формируют слоистые структуры. В этой фазе молекулы упакованы более плотно (на молекулу приходится меньшая площадь поверхности), а ацильные цепи намного более упорядочены и находятся преимущественно в полностью-*транс*-конфигурации, как и в липидных кристаллах. Поскольку цепи максимально вытянуты, толщина бислоя в фазе геля выше, чем в жидкокристаллической фазе. Плотность фазы геля несколько выше плотности жидкокристаллической фазы. В случае липидов, имеющих объемные полярные головки (например, дипальмитоилфосфатидилхолин), ацильные цепи наклонены относительно поверхности бислоя [700, 461] подобно тому, как это наблюдается в некоторых липидных кристаллах (рис. 2.1). Наклон цепей обычно обозначают штрихом ($L_{\beta'}$). Интересно, что дисперсии фосфатидилхолина в растворах, содержащих некоторые спирты [1346], в том числе и глицерол [1084], образуют необычную фазу геля, в которой противолежащие половины «бислоя» своими ацильными цепями полностью проникают друг в друга. Биологическая роль этого явления неясна.

3. *Гексагональная фаза I (H_I)*. В этом случае липидные молеку-

лы формируют цилиндрические структуры, поверхность которых образована полярными головками и контактирует с водой. Сами цилиндры упаковываются с образованием гексагональной решетки.

4. **Гексагональная фаза II (H_{II})**. Липиды также образуют цилиндры, но в этом случае полярные группы обращены внутрь цилиндра и формируют водный канал. Упаковка самих цилиндров также является гексагональной.

Очень важно, что некоторые липиды образуют небислойные структуры. Действительно, многие очищенные мембранные липиды не образуют стабильных бислоев, а предпочитают находиться в гек-

сагональной фазе H_{II} . В качестве примера можно упомянуть ненасыщенные фосфатидилэтаноламины, а также такой гликолипид, как моногалактозилдиацилглицерол (рис. 2.5). Причины такого поведения и его возможная биологическая значимость обсуждаются в следующих разделах.

Дополнение 2.1. Некоторые липиды, выделенные из биологических мембран, не образуют стабильных бислоев

На рис. 2.5 представлена фазовая диаграмма моногалактозилдиацилглицерола (МГДГ). Обратите внимание, что удаление одного сахарного остатка из полярной головки приводит к драматическим изменениям структуры водно-липидной системы: сам по себе липид не образует стабильного бислоя, а дает только гексагональную фазу H_{II} . На долю этого сильно ненасыщенного галактолипида приходится около 20% (по массе сухого вещества) тилакоидной мембраны хлоропластов и около 50% всех липидов в этой мембране [533]. Было высказано предположение [1041, 533], что МГДГ играет важную роль в стабилизации сильно искривленных участков мембраны тилакоидов, а возможно, выполняет и другие специфические функции.

Другим примером является фосфатидилэтаноламин, выделенный из бактерий *Pseudomonas fluorescens*. На долю этого липида приходится около 75% общего количества фосфолипидов бактериальных мембран [262]. Он отличается разнообразием жирных кислот по длине и степени ненасыщенности и образует стабильную гексагональную фазу H_{II} при избытке воды и комнатной температуре [1334, 262]. По-видимому, в клеточных мембранах бислойная организация этого фосфолипида стабилизируется благодаря присутствию других компонентов. Насыщенные фосфатидилэтаноламины также проявляют сложное фазовое поведение, но не образуют фазы H_{II} при физиологических температурах [1315]. Фазовые переходы, происходящие при изменении содержания воды постоянной температуры, называют *лиотропными переходами*.

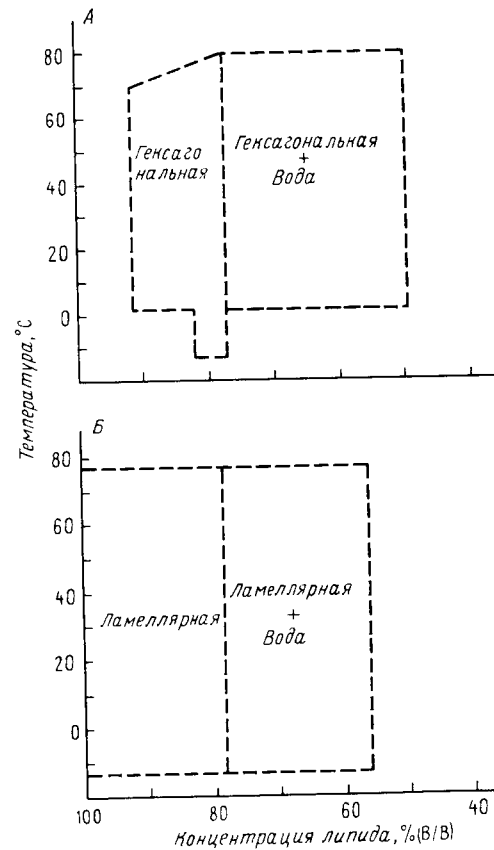


Рис. 2.5. Фазовые диаграммы для моногалактозилдиацилглицерола (МГДГ) (А) и дигалактозилдиацилглицерола (ДГДГ) (Б), экстрагированных из листьев [1334a]. В обоих случаях ацильные цепи характеризуются высокой степенью ненасыщенности.

2.2.1. ГИДРАТАЦИЯ ЛИПИДОВ

Параметры, указанные на рис. 2.4, можно определить по данным дифракции рентгеновских лучей [1320, 910]. Как правило, те

параметры, которые зависят главным образом от длины ацильных цепей, почти не меняются при увеличении содержания воды в системе. Гидратация липидов происходит в результате связывания воды с полярными головками. Процесс гидратации активно изучали методами ^1H - и ^2H -ЯМР. Результаты, полученные при изучении фосфатидилглицерола, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина методом ^2H -ЯМР, говорят о наличии гидратной оболочки из 11 — 16 молекул воды на одну молекулу липида. Эти молекулы быстро обмениваются с молекулами воды, находящимися в основном объеме [123]. Согласно другим измерениям, полярная головка фосфатидилэтаноламина связывает меньше воды, чем полярная головка фосфатидилхолина. Было высказано предположение, что в случае ненасыщенных фосфатидилэтаноламинов слабая гидратация благоприятствует образованию неламеллярной гексагональной фазы H_{II} [1616].

Многие липиды набухают в воде. Липиды, которые не несут заряда или являются в целом электрически нейтральными (например, фосфатидилхолин), не набухают совсем или набухают лишь в ограниченной степени до предельной толщины водной прослойки между ламеллами [195, 600]. При избытке воды сосуществуют две фазы — мультиламеллярная липидная фаза и вода, находящаяся в основном объеме. Заряженные липиды склонны к неограниченному набуханию и могут включать воду между ламеллами вплоть до пороговой точки, когда образуются две фазы — полностью гидратированные моноламеллярные везикулы, находящиеся в равновесии с водой в основном объеме [600]. Степень набухания и относительная стабильность мульти- и моноламеллярных структур определяются электростатическими взаимодействиями. При низкой ионной силе происходит дестабилизация мультиламеллярных структур. Неограниченное набухание может происходить и в том случае, когда в смеси липидов содержится всего несколько процентов заряженных липидов.

Поляризация молекул воды вблизи полярных липидных головок приводит к сильному отталкиванию при сближении двух бислоев [1193, 195]. Эта «гидратационная сила» удерживает гидратированные бислои на расстоянии не менее 30 Å друг от друга. Именно она создает основной энергетический барьер, который следует преодолеть, пытаясь осуществить слияние мембран (см. гл. 9). Возможно, фосфатидилэтаноламиновые везикулы склонны к агрегации именно потому, что степень гидратации их полярных головок относительно низка (см. разд. 9.5.1).

Исследования, проведенные методом ЭПР с помощью спиновых меток, способных реагировать на полярность своего окружения на различной глубине от поверхности бислоя, показывают, что вода частично проникает в углеводородную область бислоя, находящую-

ся в жидкокристаллическом состоянии [551]. По данным нейтронного рассеяния, когда бислои находятся в состоянии геля, вода не проникает глубже глицеролового остова липидных молекул [1606].

2.2.2. ФАЗОВЫЕ ДИАГРАММЫ ОДНОКОМПОНЕНТНЫХ ВОДНО-ЛИПИДНЫХ СИСТЕМ

На рис. 2.5 представлена фазовая диаграмма в координатах температура—концентрация для двух распространенных гликолипидов, выделенных из растений [1334, 1041, 533]. Дигалактозилдиацилглицерол (ДГДГ) образует стабильную ламеллярную фазу. При низком содержании воды имеется только гидратированная фаза, а при содержании воды 20% сосуществуют две фазы — мультиламеллярная гидратированная липидная фаза и вода основного объема. К неограниченному набуханию ДГДГ не способен.

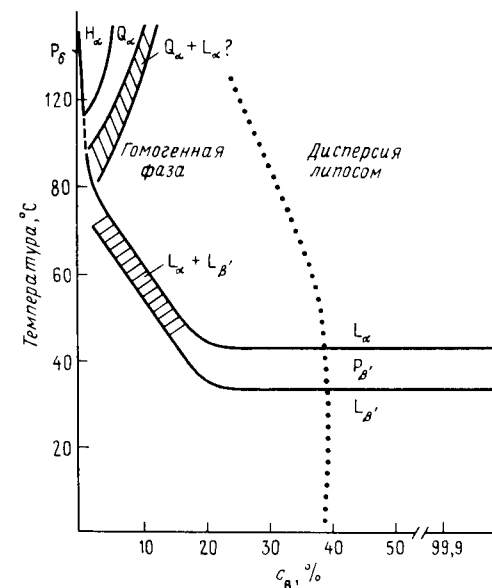


Рис. 2.6. Фазовая диаграмма для дипальмитоилфосфатидилхолина в воде [1269]. Содержание воды указано на оси абсцисс; в левой части диаграммы представлены смеси с высоким содержанием липида, справа — разбавленные дисперсии липосом. Указаны ламеллярная гелевая фаза ($L_{\beta'}$), ламеллярная жидкокристаллическая фаза (L_{α}) и промежуточная рифленая фаза ($P_{\beta'}$). При высокой температуре и низкой гидратации могут образовываться другие фазы — Q_{α} (кубическая фаза) и H_{II} (гексагональная фаза). Пунктирная линия — граница максимальной адсорбции воды с образованием гомогенной водно-липидной смеси.

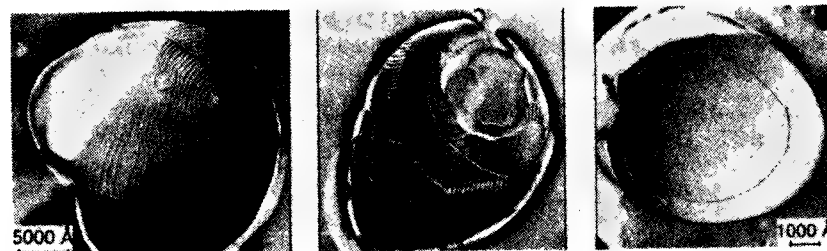


Рис. 2.7. Электронные микрофотографии препаратов, полученных методом замораживания—травления [1269]. Видна текстура гелевой ($L_{\beta'}$), рифленой ($P_{\beta'}$) и жидкокристаллической (L_{α}) фаз изолированных фосфатидилхолинов. А. Дипальмитоилфосфатидилхолин при 25 °С. Б. Дипальмитоилфосфатидилхолин при 35 °С. В. Димиристоилфосфатидилхолин при 25 °С. Фотографии любезно предоставлены д-ром E. Sackmann.

На рис. 2.6 приведена фазовая диаграмма для дипальмитоилфосфатидилхолина [1269]. Этот липид существует в ламеллярной форме при самых разных условиях. При добавлении воды он «набухает» до тех пор, пока между слоями не скопится максимально возможное количество воды. В этой точке образуется двухфазная система, представляющая собой взвесь мультиламеллярных липосом. Обратите внимание, что между фазой геля ($L_{\beta'}$) и жидкокристаллической ламеллярной фазой (L_{α}) имеется еще одна фаза. Это так называемая «рифленая» фаза ($P_{\beta'}$). В этой фазе поверхность бислоя на электронных микрофотографиях имеет волнообразный вид (рис. 2.7). Температурный фазовый переход $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$ называется главным, а переход $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$ — предпереходом (разд. 2.4).

Липиды, имеющие объемные полярные головки (например, фосфатидилхолин), обычно претерпевают предпереход, свидетельствующий о наличии фазы, промежуточной между гелевой и жидкокристаллической [604]. В $P_{\beta'}$ -фазе дипальмитоилфосфатидилхолина ацильные цепи, вероятно, наклонены [461], хотя спектры комбинационного рассеяния [181] говорят о том, что они по-прежнему, как и в фазе геля, находятся преимущественно в полностью-транс-конфигурации (разд. 2.4).

2.2.3. ДВА МЕТОДА ИЗУЧЕНИЯ ЛИПИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА

Кроме метода дифракции рентгеновских лучей для характеристики свойств липидных фаз использовали и другие методы. Один из них, оказавшийся особенно полезным, — это электронная мик-

роскопия замороженных сколов. Второй метод, ^{31}P -ЯМР, был введен в исследовательскую практику несколько позже и нашел применение для обнаружения небислойных структур, которые, как полагают, играют особую роль в биологических мембранах [1507, 264].

1. *Электронная микроскопия липидных фаз с применением метода замораживания—травления.* Этот метод оказался очень полезным при изучении структурной организации различных липидных фаз (см. гл. 1 и работы [263, 313, 1509, 783]). Примеры получаемых при этом электронных микрофотографий приведены на рис. 2.7. Жидкокристаллическая фаза (L_{α}) на этих микрофотографиях всегда выглядит как гладкая поверхность, а $P_{\beta'}$ -фаза — как рифленая. Гелевая фаза ($L_{\beta'}$) выглядит как гладкая поверхность, но при определенных условиях приготовления препарата имеет спиральную текстуру из-за возникновения случайных дефектов в плотной упаковке. Гексагональная фаза (H_{II}), образуемая такими липидами, как ненасыщенный фосфатидилхолин, выявляется на микрофотографиях после замораживания—травления (рис. 2.8) как стопка цилиндров. При приготовлении образцов липиды уравниваются в условиях, подходящих для формирования нужных структур, а затем быстро замораживают, чтобы организация этих структур не успела измениться.

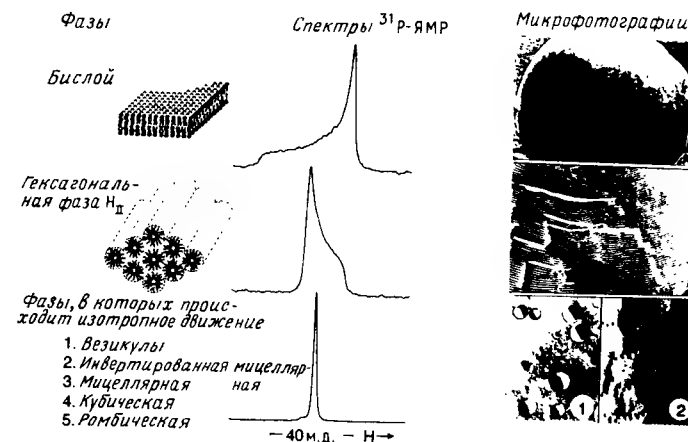


Рис. 2.8. Характеристика различных фаз, образуемых фосфолипидами, по данным ^{31}P -ЯМР и электронной микроскопии (замораживание—травление) [263]. Обратите внимание, что ламеллярная жидкокристаллическая фаза L_{α} и гексагональная фаза H_{II} имеют существенно разные спектры ^{31}P -ЯМР и по-разному выглядят на электронных микрофотографиях. Бислойная структура получена из яичного фосфатидилхолина, а гексагональная фаза — из фосфатидилхолина соевых бобов. Узкие линии в спектре ^{31}P -ЯМР, свидетельствующие о быстром движении молекул, чаще всего наблюдаются либо для малых мономембранных везикул (фото 1), либо для больших липидных структур, содержащих «липидные частицы» (фото 2). Фотографии любезно предоставлены д-ром P. Cullis и д-ром M. Hope.

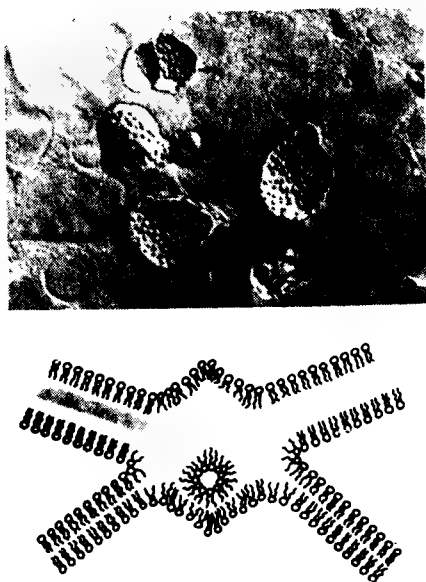


Рис. 2.9. Электронная микрофотография липидных частиц, образующихся в присутствии Ca^{2+} из смеси соевого фосфатидилэтаноламина и кардиолипина (4:1, молярное отношение) [263]. Препарат получен методом замораживания—скальвания. Внизу представлена модель липидной частицы, предполагающая, что она имеет форму вывернутой мицеллы. Заштрихованная область — место скола. Рисунок любезно предоставлен д-ром Р. Cullis и д-ром М. Норе.

Электронно-микроскопические методы использовались также для изучения «липидных частиц» (рис. 2.9). Эти частицы нередко наблюдаются в бинарных смесях, если один из липидов склонен образовывать фазу H_{II} , а другой — бислойные структуры [263, 1507, 1508]. Липидные частицы образуются в чисто липидных образцах и потому отличаются от «белковых частиц», которые наблюдаются в биологических мембранах и в реконструированных белково-липидных системах (см. рис. 1.6). Было высказано предположение, что липидные частицы представляют собой вывернутые мицеллы, расположенные внутри бислоя, и что они играют определенную роль в биологических процессах, облегчая слияние мембран или стабилизируя их на сильно искривленных участках, как, например, в мембране тилакоидов [263, 1507, 1041, 533]. Однако четких доказательств биологической роли липидных частиц пока не получено.

2. Исследование бислоев методом ^{31}P -ЯМР [1454]. Этот метод также используется для структурной характеристики гидратированных липидов [263, 1318, 264, 266, 487, 748]. Например, фосфолипи-

ды в гексагональной фазе H_{II} дают спектры ^{31}P -ЯМР, резко отличающиеся от спектров фосфолипидов в ламеллярной фазе [266, 487] (рис. 2.8). С помощью этого метода исследовался переход ламеллярной фазы в гексагональную в липидах и липидных смесях [487, 748]. Недостатком метода является некоторая неопределенность при интерпретации спектров в случае изотропного усреднения за счет относительно быстрых движений. Полагают, что такой спектр отвечает структурам типа «липидных частиц», однако это объяснение не является единственно возможным. Как было показано, метод ^{31}P -ЯМР позволяет надежно установить наличие гексагональной H_{II} -фазы в чисто липидных дисперсиях, но в случае биологических мембран к подобным выводам следует относиться с осторожностью, особенно если они не подтверждены другими методами.

Метод ^{31}P -ЯМР оказался весьма полезным при определении ориентации и динамического поведения полярных головок фосфолипидов, а также структурных возмущений, вносимых в бислой мембранными белками (см. следующий раздел и гл. 5).

2.2.4. ОРИЕНТАЦИЯ ПОЛЯРНЫХ ГОЛОВЕК ЛИПИДОВ В БИСЛОЕ [604, 1320]

Данные ряда методов свидетельствуют о том, что в ламеллярных водно-фосфолипидных дисперсиях, как и в липидных кристаллах, полярные головки липидов в целом ориентированы параллельно плоскости бислоя (разд. 2.1). В случае фосфатидилхолинов такая ориентация присуща как гелевой, так и жидкокристаллической фазам, судя по результатам исследований методами дифракции нейтронов и рентгеновских лучей. Об этом же свидетельствуют и данные, полученные методом ^2H -ЯМР, хотя при этом не исключаются и другие интерпретации. Имеющиеся данные указывают на то, что пространственное расположение полярных головок фосфатидилглицерина, сфингомиелина и фосфатидилсерина сходно. Исследования методом ^2H -ЯМР intactных фибробластов мыши и выделенных из них мембран также показали, что полярные головки как фосфатидилхолина, так и фосфатидилэтаноламина ориентированы параллельно поверхности мембран [1293]. Однако по данным дифракции нейтронов у фосфатидилглицерола, выделенного из *E. coli*, полярная головка ориентирована примерно под углом 30° к поверхности мембраны, что облегчает связывание отрицательно заряженных фосфатных групп с катионами [995].

На ориентацию и динамику полярных головок липидных молекул может влиять образование межмолекулярных водородных связей на поверхности мембраны [115]. Донорами и акцепторами при образовании этих связей могут служить такие липиды, как фосфа-

тидилсерин, фосфатидилэтаноламин и различные гликолипиды. Исследования, проведенные на модельных мембранных системах, показывают, что водородные связи между полярными головками сохраняются даже в условиях гидратации мембранной поверхности, однако пока неизвестно, как образование этих связей может сказаться на структуре биологических мембран.

2.2.5. КОНФИГУРАЦИЯ И УПАКОВКА АЦИЛЬНЫХ ЦЕПЕЙ В БИСЛОЕ

Рассмотрим сначала насыщенные углеводородные цепи. В них возможно свободное вращение вокруг каждой С—С-связи, характеризующееся энергетическим минимумом, особенно четким в случае Ньюменовской проекции (рис. 2.10). Наиболее стабильна *транс*-конфигурация, при этом высота энергетического барьера для перехода через заслоненную конфигурацию в *гош*-форму составляет по оценкам 3,5 ккал/моль. В полностью *транс*-конфигурации цепь максимально вытянута и не меняет своего направления, тогда как в *гош*-конформации ее направление меняется. Последовательность *гош-транс-гош* для трех смежных С—С-связей приводит к появлению в цепи излома (кинка), в результате чего участки цепи выше и ниже места излома оказываются значительно смещенными друг относительно друга (рис. 2.11). *Гош*-конфигурация в зависимости от направления вращения при переходе от C_1 к C_4 обозначается как g^+ или g^- (см. рис. 2.10). Кинки типа g^+tg^- или g^-tg^+ приводят к минимальному сдвигу цепи. Почти все двойные связи в мембранных липидах находятся в *цис*-конфигурации. Как и в случае *гош*-конфигурации, это приводит к изменению общего направления цепи. Наличие в углеводородных цепях кинков, двойных *цис*-связей,

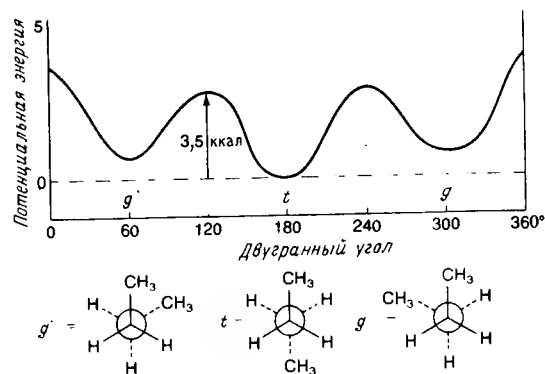


Рис. 2.10. Профиль потенциальной энергии вращения вокруг связи С—С в алкане [535]. Внизу представлены Ньюменовские проекции для *гош*- и *транс*-конфигураций бутана с минимальной энергией: g^+ , g^- и t .

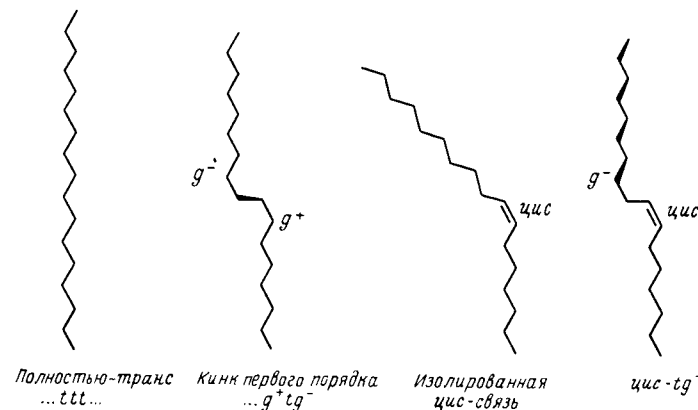


Рис. 2.11. Различные конфигурации алкильной цепи [808].

циклопропановых групп [352] и других особенностей приводит к увеличению площади поперечного сечения цепи (минимальное ее значение составляет около $19 \text{ \AA}^2$ при полностью-*транс*-конфигурации); это может иметь важные последствия для упаковки липидов в бислое. При этом стерические требования к упаковке углеводородных цепей и полярных головок такие же, как и в липидных кристаллах (разд. 2.1). Эти принципы будут обсуждаться в разд. 2.3 при анализе формы мицелл.

Многие методы, включая дифракцию рентгеновских лучей и нейтронов, спектроскопию КР и ИК-спектроскопию, указывают, что в фазе геля насыщенные углеводородные цепи фосфолипидов находятся преимущественно в полностью-*транс*-конфигурации [604, 1320]. Минимальная площадь поперечного сечения молекулы диацильного фосфолипида равна около $38 \text{ \AA}^2$ (2Σ на рис. 2.2). Примерно такую площадь занимает полярная головка фосфатидилэтаноламина, поэтому насыщенные фосфатидилэтаноламины в гелевой фазе упаковываются так, что ацильные цепи располагаются перпендикулярно плоскости бислоя, как и в липидных кристаллах. В случае же кристаллов фосфатидилхолина [605, 1133] минимальная площадь, приходящаяся на одну полярную головку, составляет примерно $50 \text{ \AA}^2$. Поэтому дипальмитоилфосфатидилхолин в гелевой фазе не может упаковываться так, как фосфатидилэтаноламин. В этом случае ацильные цепи дипальмитоилфосфатидилхолина отклоняются на 30° от нормали к бислою, благодаря чему их поперечное сечение увеличивается и достигается соответствие размеру полярной головки. При этом углеводородные цепи сохраняют полностью-*транс*-конфигурацию. В жидкокристаллической фазе появление в цепи *гош*-конформеров увеличивает эффективное поперечное сече-

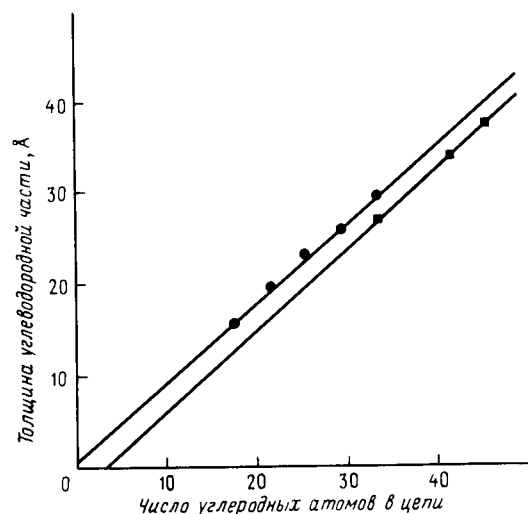


Рис. 2.12. Зависимость толщины углеводородной части бислоя, измеренной по данным рассеяния рентгеновских лучей, от числа углеродных атомов в цепи [848]. Счет углеродных атомов ведется от положения С-2 в каждой цепи. Для измерений использовались диацилфосфатидилхолины в жидкокристаллическом состоянии. Точки — насыщенные цепи, квадратики — моionoенасыщенные ацильные цепи. Площадь, приходящаяся на молекулу, составила от 65 до 70 Å².

ние цепей по меньшей мере до 50 Å² в расчете на молекулу диацильного фосфолипида, а в водных дисперсиях эффективная площадь, приходящаяся на молекулу фосфолипида, составляет обычно 60 — 70 Å² [604]. Следовательно, в жидкокристаллической фазе углеводородные цепи не наклонены к плоскости бислоя, поскольку в этих условиях полярные головки липидных молекул достаточно удалены друг от друга, и чтобы заполнить пространство между соседними головками и перекинуть между ними мостики, требуются вода и другие полярные молекулы. Судя по данным ²H-ЯМР, толщина углеводородной области дипальмитоилфосфатидилхолинового бислоя в жидкокристаллическом состоянии составляет 35, а не 45 Å, как следовало ожидать, если бы цепи находились в полностью-*транс*-конфигурации и были ориентированы вдоль нормали к бислою [1320]. Толщина бислоя уменьшается за счет наличия к цепях *гош*-конформеров, приводящих к разупорядоченности цепей, причем сами цепи в целом растянуты и расположены перпендикулярно поверхности бислоя, а не скручены в спираль. На рис. 2.12 приведена линейная зависимость толщины жидкокристаллического бислоя в диацилфосфатидилхолиновых везикулах от длины ацильных цепей, построенная по данным рассеяния рентгеновских лучей [848].

2.2.6. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГИДРОФОБНОЙ ОБЛАСТИ БИСЛОЯ

Для получения детальной картины строения внутренней области бислоя особенно полезными оказались два метода: ²H-ЯМР и ИК- и КР-спектроскопия. Применение ¹H- ¹³C-ЯМР для исследования мембран и водно-липидных систем затруднено, поскольку для получения пригодных для исследования малых везикул или мембранных фрагментов необходима предварительная фрагментация мембранного препарата с помощью ультразвука. Впрочем, если вращать образец под магическим углом, то необходимость в такой обработке отпадает, и это открывает новые возможности для более широкого применения последних методологических достижений ЯМР при изучении модельных и биологических мембран [1093].

Применение методов ²H-ЯМР и колебательной спектроскопии не сопровождается возмущениями бислоя, поскольку в этих методах не используются зонды, которые могли бы исказить структуру окружающих их липидов. Ниже приведены краткое описание этих методов и сводка результатов, полученных при изучении конфигурации ацильных цепей. Применение зондов для изучения мембран методами ЭПР или флуоресценции будет обсуждено в гл. 5 в связи с исследованиями динамики мембран и липидно-белковых взаимодействий.

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР)

Лазерная спектроскопия комбинационного рассеяния оказалась весьма полезной для изучения физического состояния модельных и биологических мембран (см. обзоры [1513, 1544]). Этот метод основан на измерении разности энергии падающего света и света, рассеянного за счет колебательных движений. Тип колебаний и их интенсивность очень сильно зависят от физического состояния липидов, поэтому спектры фосфолипидов в фазе геля и жидкокристаллическом состоянии существенно различаются [477]. Особенно полезны для регистрации этих различий валентные колебания связи С—С. Например, появление *гош*-конформеров при плавлении углеводородных цепей приводит к увеличению интенсивности полосы при 1080 см⁻¹. Этот метод показывает, что некоторая доля *гош*-конформеров сохраняется и в состоянии геля до тех пор, пока температура не снизится до очень низких значений, около -200°С. Заметим, что колебания часто охватывают всю молекулу, так что количественная интерпретация спектров с точки зрения анализа влияния отдельных конформаций является непростой задачей.

Обычно образцы представляют собой суспензию липидов в концентрации около 1 мг/мл. Мембраны, содержащие хромофоры (на-

пример, гем) или флуоресцирующие примеси, непригодны для изучения. Фоновая флуоресценция делает невозможным измерение относительно слабых сигналов комбинационного рассеяния, а поглощение хромофорами лазерного излучения приводит к нагреванию образца.

Инфракрасная (ИК) спектроскопия

Этот метод также основан на регистрации колебательных спектров молекул, но до недавнего времени его применение для изучения биологических объектов было ограниченным из-за невозможности работы с водными суспензиями. После разработки современных ИК-спектрометров с фурье-преобразованием многие из этих проблем были решены. В настоящее время опубликовано немало работ по изучению липидных дисперсий и биологических мембран методом фурье-ИК-спектроскопии [190, 32]. Преимущества этого метода перед спектроскопией КР состоят в его значительно более высокой чувствительности, а также в том, что флуоресцирующие примеси или хромофоры не мешают измерениям. Как и в случае спектроскопии КР, фурье-ИК-спектры чувствительны к изменениям полиморфно-фазового состояния липидов. Поэтому фурье-ИК-спектроскопия использовалась для изучения предпереходов в фосфатидилхолиновых бислоях [181], главного фазового перехода гель—жидкий кристалл [180], а также перехода яичного фосфатидилэтаноламина из ламеллярной фазы в гексагональную H_{II} -фазу [919].

Изменение конформации липидных цепей сопровождается частотным сдвигом полос поглощения групп CH_2 , причем эти изменения коррелируют с изменением доли *gauche*-конформеров в цепях. Например, в присутствии холестерина число *gauche*-конформеров в дипальмитоилфосфатидилхолине при температурах выше температуры главного фазового перехода снижается [250], что согласуется с изменениями упорядоченности бислоя, измеренной методом 2H -ЯМР [1092]. Встраивание в бислой интегрального мембранного белка (см. гл. 5) оказывает совершенно иной эффект: число *gauche*-конформеров в жидкокристаллической фазе практически не изменяется, но увеличивается их содержание в фазе геля, поскольку белки мешают ацильным цепям упаковываться в полностью-*транс*-конфигурации [250].

2H -ЯМР

Более детальную картину строения гидрофобной области липидного бислоя удалось получить с помощью метода 2H -ЯМР [1319, 291]. Атомы водорода в определенных местах липидной молекулы можно избирательно заменить дейтерием. Это сравнительно мяг-

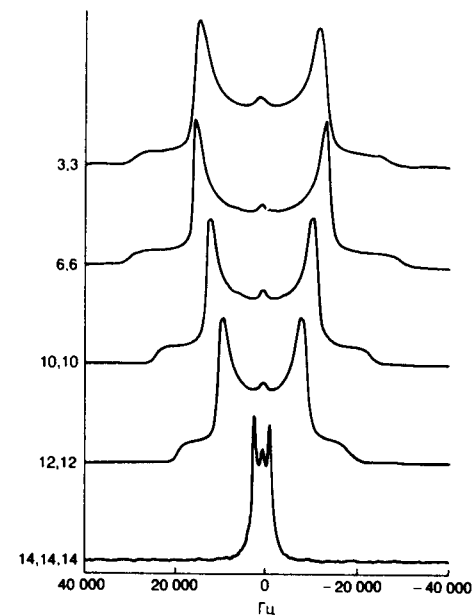


Рис. 2.13. Спектры 2H -ЯМР димиристоилфосфатидилхолина, дейтерированного по разным положениям ацильной цепи. Числа слева обозначают положение двух (или трех) атомов дейтерия в каждой цепи. Обратите внимание, что спектр образца с дейтерированной концевой метильной группой (14,14,14) гораздо уже всех остальных приведенных спектров, что указывает на значительную неупорядоченность центральной области бислоя. Рисунок любезно предоставлен д-ром E. Oldfield.

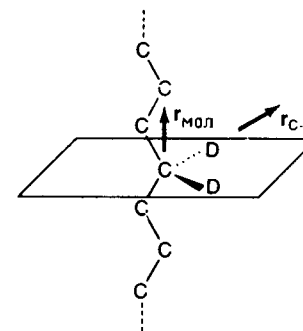


Рис. 2.14. Вектор r_{mol} , характеризующий ориентацию данного сегмента цепи, и вектор r_{C-D} , направленный вдоль связи $C-D$, которые используются при расчете параметра упорядоченности по данным 2H -ЯМР.

кий способ зондирования мембран, и считается, что он, как правило, не вносит возмущений в их структуру. Спектры некоторых дейтерированных димиристоилфосфатидилхолинов представлены на рис. 2.13. Расстояние между двумя пиками $\Delta\nu_Q$, называемое квадрупольным расщеплением, зависит от усредненной по времени ориентации вектора C—D-связи по отношению к нормали к бислою (рис. 2.14). Усредненную по времени ориентацию можно выразить через параметр упорядоченности следующим образом:

$$S_{CD} = 1/2 (3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1),$$

где $\langle \cos^2 \theta \rangle$ отражает усреднение ориентации по времени, а S_{CD} является параметром упорядоченности связи. Необходимо подчеркнуть, что результат измерения является величиной, усредненной по всем молекулам.

Для $\theta = 0^\circ$ $\langle \cos^2 \theta \rangle = 1$ и $S_{CD} = 1$.

Для $\theta = 90^\circ$ $\langle \cos^2 \theta \rangle = 0$ и $S_{CD} = -1/2$.

При хаотичной ориентации $\langle \cos^2 \theta \rangle = 1/3$ и $S_{CD} = 0$.

В литературе часто используется *параметр молекулярной упорядоченности* $S_{\text{мол}}$, который характеризует ориентацию вектора, перпендикулярного плоскости, образуемой группой CD_2 (рис. 2.14). Этот параметр описывает усредненную ориентацию данного сегмента ацильной цепи:

$$S_{\text{мол}} = -2S_{CD}.$$

Параметр упорядоченности, получаемый с помощью метода ^2H -ЯМР, отражает усредненную ориентацию и мало что говорит о динамике системы и о характере движений.

Особое значение имеет тот факт, что локальное магнитное поле, в котором находится конкретный атом дейтерия, зависит от ориентации C—D-связи по отношению к внешнему магнитному полю. Колебательные и вращательные движения молекулы, которые влияют на ориентацию C—D-связи в бислое в целом, происходят с достаточно большой скоростью ($> 10^6 \text{ с}^{-1}$), так что любой атом дейтерия воспринимает единое усредненное магнитное окружение. Это окружение зависит от соседних атомов, а также от ограничений движения по типу и амплитуде. В этом отношении метод ^2H -ЯМР отличается от КР- и ИК-спектроскопии, поскольку переходы *транс*- и *гош*-совершаются с гораздо меньшей частотой (10^9 с^{-1}), чем разность частот колебательных полос, отвечающих этим формам ($\sim 10^{12} \text{ Гц}$). Поэтому ИК- и КР-спектры дают картину, которую можно назвать моментальной фотографией вклада *транс*- и *гош*-ротамеров в спектральные параметры. Для измерения параметров упорядоченности применяют и другие методы, в частности спектроскопию ЭПР и флуоресцентную спектроскопию. Об этих методах, связанных с использованием зондов, разговор пойдет в гл. 5.

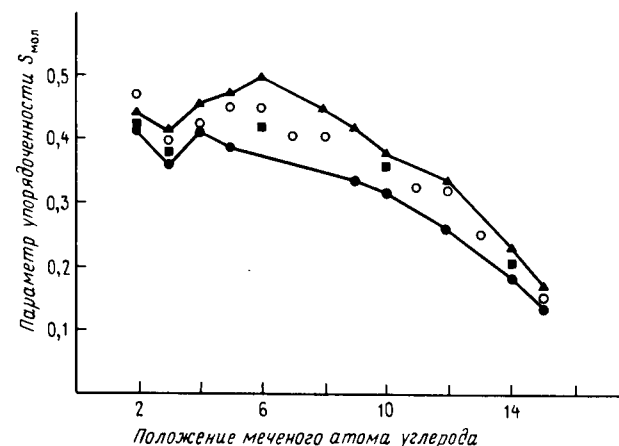


Рис. 2.15. Нормированные профили упорядоченности для различных бислоев, иллюстрирующие зависимость параметра молекулярной упорядоченности от положения углеродного атома в ацильной цепи [1321]. Темные кружки — дипальмитоилфосфатидилхолин, темные треугольники — 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин, темные квадратики — дипальмитоилфосфатидилсерин, светлые кружки — мембрана *Acholeplasma laidlawii*.

На рис. 2.15 приведены параметры упорядоченности, определенные по данным ^2H -ЯМР для нескольких селективно дейтерированных фосфолипидов, в которых атом дейтерия включен в определенные метиленовые группы *sn*-1-пальмитоильного остатка. Исследовались как липидные бислои, так и природные мембраны, находящиеся в жидкокристаллическом состоянии, поскольку в случае фазы геля спектры очень уширяются из-за плотной упаковки липидов и потому с трудом поддаются анализу. Эти данные позволяют сделать два вывода.

1. Параметр упорядоченности довольно постоянен на участке от C-2 и до примерно C-8 или C-10. Метиленовые группы в средней части бислоя значительно более разупорядочены, чем группы ближе его поверхности.

2. Для синтетических липидов разных типов, включая фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и сфингомиелин, а также для биологических мембран, содержащих дейтерированные зонды, получен одинаковый профиль параметра упорядоченности. Таким образом, характер упорядоченности бислоя мало зависит от химического строения липида и от состава мембраны, если бислой находится в жидкокристаллическом состоянии.

Количественный анализ этих данных можно провести на основе молекулярного моделирования с использованием методов статисти-

ческой механики (см. работу [921] и обзор [1161]). Например, приведенные результаты согласуются с наличием в каждой цепи дипальмитоилфосфатидилхолина четырех или пяти *gosh*-ротамеров при очень малом содержании кинков (0,5 кинка на цепь) [1320]. Поскольку каждая цепь закреплена у поверхности бислоя, участок цепи вблизи поверхности наиболее упорядочен. Обратите внимание, что бислоем — это высококооперативная система. Ацильная цепь не может изменить свое направление без компенсационных изменений соседних цепей. Поэтому группа смежных сегментов цепи должна двигаться кооперативно. Отклонения ориентации сегментов цепи от нормали к бислою будут усиливаться по мере перехода от поверхности бислоя к его центральной области. Поэтому разупорядоченность максимальна в середине бислоя, где подвижность цепей такая же, как в жидком парафине. Данные других методов также показывают, что молекулярная подвижность максимальна в центре бислоя. Но необходимо отметить, что неупорядоченность — это статистический параметр, который ничего не говорит о характере движения. Так, можно иметь сильно неупорядоченную структуру (например, оконное стекло), которая в то же время обладает малой подвижностью (см. гл. 5).

Дифракция нейтронов

Селективно дейтерированные фосфолипиды можно также исследовать методом дифракции нейтронов [1320]. Если рентгеновские лучи рассеиваются на электронах, то нейтроны — на ядрах атомов. Рассеивающие свойства ^1H и ^2H сильно различаются, что позволяет выявлять дейтерированные области по кривой плотности рассеяния. Например, судя по данным дифракции нейтронов, атом C-5 находится на расстоянии 15 Å от центра дипальмитоилфосфатидилхолинового бислоя в фазе геля; это соответствует полностью вытянутой *транс*-конфигурации цепей [161]. Используя D_2O в качестве растворителя, можно определить локализацию воды в фазе геля; полученные данные показывают, что вода проникает до области локализации глицерольных остатков [1606, 622]. С помощью рассеяния нейтронов можно определить также локализацию ионов, таких, как Ca^{2+} [622] (см. гл. 7).

2.3. Термодинамика полиморфизма липидных структур

Данные, представленные в предыдущем разделе, показывают, что гидратированные липиды обладают структурным полиморфизмом. Во всех липидных структурах неполярные углеводородные области молекул агрегируют, а полярные головки контактируют с во-

дой. В этом разделе мы кратко рассмотрим термодинамические принципы образования мицелл амфифильными липидами. Термодинамический анализ будет проводиться с учетом геометрической формы молекул, что позволит с единых позиций рассмотреть такие разные вопросы, как механизм разрушения мембран под действием детергентов и механизм влияния холестерина на фосфолипидный бислой.

2.3.1. ГИДРОФОБНЫЕ СИЛЫ [1432]

С точки зрения термодинамики основной силой, стабилизирующей гидратированные липидные агрегаты, являются гидрофобные взаимодействия. К другим стабилизирующим факторам относятся:

1. *Вандерваальсовы силы*: короткодействующие слабые силы притяжения между соседними гидрофобными цепями. Притяжение возникает за счет взаимодействия между индуцированными диполями.

2. *Водородные связи*: образуются между полярными головками некоторых липидов (например, между молекулами фосфатидилэтаноламина) [115]. В ряде случаев мостики между отрицательно заряженными липидами образуются с помощью двухвалентных катионов.

Все эти силы по своей стабилизирующей способности значительно уступают гидрофобным взаимодействиям. Под действием гидрофобных сил система принимает такую структурную организацию, при которой сводятся к минимуму контакты между неполярными участками липидных молекул и водой. Эти силы имеют энтропийную природу и связаны с ограничениями, налагаемыми на упаковку молекул воды вокруг неполярных углеводородов.

Динамическая структура чистой воды весьма сложна, однако ясно, что она стабилизируется прежде всего межмолекулярными водородными связями [1392]. Когда какой-либо ион, например Cl^- , попадает в воду, он сольватируется, при этом молекулы воды образуют вокруг него гидратную оболочку. С точки зрения энтропии упорядочение молекул воды невыгодно, но это с избытком компенсируется сильными электростатическими взаимодействиями, так что суммарное изменение свободной энергии при растворении соли в воде оказывается термодинамически выгодным. Когда в воде растворяется неполярное вещество, структура воды вокруг каждой молекулы также нарушается. Молекулы воды стремятся ориентироваться таким образом, чтобы сохранились межмолекулярные водородные связи (каждая из них дает около 5—7 ккал/моль), но поскольку те молекулы воды, которые непосредственно контактируют с молекулами растворенного неполярного вещества, соседствуют с меньшим числом молекул воды, в системе возникают зна-

чительные структурные напряжения. Это приводит к уменьшению энтропии системы, причем в данном случае компенсирующие электростатические взаимодействия отсутствуют. В результате суммарное изменение свободной энергии при переносе неполярного вещества из неполярного растворителя (например, гептана) в воду термодинамически неблагоприятно из-за энтропийных эффектов, связанных с нарушением структуры воды как растворителя. Аналогией водных систем с растворенными в них неполярными молекулами могут служить кристаллогидраты неполярных молекул или атомов (например, аргона), в которых вода образует решетки или клатраты, окружающие «растворенное» вещество [460].

Невыгодные взаимодействия между неполярным растворимым веществом и водой — это и есть «гидрофобные силы». С помощью термодинамических измерений можно количественно оценить стремление неполярных веществ минимизировать контакты с водой. Гидрофобные силы являются главным фактором стабилизации практически всех биологических макромолекулярных структур, включая глобулярные белки, а также фосфолипидный бислой. «Гидрофобность» таких простых молекул, как углеводороды, можно количественно оценить по данным равновесного распределения растворимого вещества (скажем, этана) между двумя растворителями, например водой и гептаном.

Выразим концентрацию растворенного вещества в воде и в углеводороде в мольных долях, $[X]_{H_2O}$ и $[X]_{HC}$. Тогда константа равновесия K будет равна

$$\frac{[X]_{H_2O}}{[X]_{HC}} = K, \quad (2.1)$$

$$a - RT \ln K = \Delta G_{\text{перенос}}^{\circ} = (\mu_{H_2O}^{\circ} - \mu_{HC}^{\circ}). \quad (2.2)$$

Стандартная свободная энергия переноса вещества из одной фазы в другую, $\Delta G_{\text{перенос}}^{\circ}$, является мерой его гидрофобности [1432]. Показано, что гидрофобность пропорциональна площади поверхности контакта между водой и неполярным растворенным веществом [1212]. Чем крупнее молекула (например, молекула углеводорода с длинной цепью), тем значительнее нарушения структуры воды из-за увеличения площади контакта. Как видно из рис. 2.16, гидрофобность углеводородов возрастает пропорционально площади их поверхности. Используя вандерваальсов радиус для расчета площади поверхности контакта между молекулами воды и углеводородами, подсчитали, что $\Delta G_{\text{перенос}}^{\circ}$ составляет около -25 кал/Å^2 . Для углеводородов с неразветвленной цепью гидрофобность составляет около -800 кал/моль в расчете на одну $-\text{CH}_2-$ группу. Другими словами, при увеличении длины цепи на два метиленовых звена константа равновесия увеличивается в 10 раз.

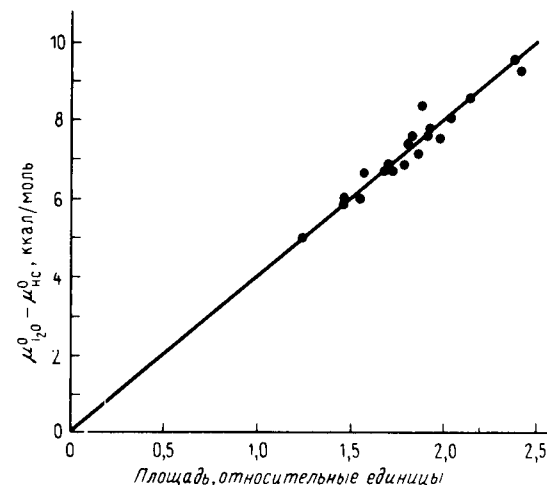


Рис. 2.16. Зависимость свободной энергии переноса углеводородов из липидной фазы в водный раствор при 25 °C от относительной площади поверхности молекулы [1212]. Площадь поверхности изобутана в принятом здесь масштабе составляет 1,45.

2.3.2. ОБРАЗОВАНИЕ МИЦЕЛЛ

Рассмотрим, что происходит при растворении углеводородов с длинной цепью в воде. Из-за весьма неблагоприятных «гидрофобных» взаимодействий, описанных в предыдущем разделе, их растворимость будет очень мала. Такие углеводороды, как додекан (C_{12}), смогут растворяться в воде лишь до определенной концентрации, а выше этой концентрации они будут образовывать отдельную фазу. При дальнейшем добавлении додекана будет просто увеличиваться содержание додекановой фазы, а концентрация додекана, растворенного в воде, не изменится (рис. 2.17).

Посмотрим теперь, что произойдет при попадании в воду амфифильной молекулы, например додецилсульфата натрия (ДСН). Молекула этого типичного детергента состоит из неполярной части (додецильной цепи) и из сильно заряженной полярной группы (сульфата), расположенной на одном из концов цепи. Когда достигается предел растворимости мономерной формы этого детергента, он также образует отдельную фазу. Однако в данном случае эта «фаза» диспергирована в виде небольших агрегатов, называемых мицеллами, по всему объему воды. Поскольку взаимодействия между полярной головкой (в данном случае сульфатом) и водой являются более предпочтительными, то энергетически выгодно, чтобы эта

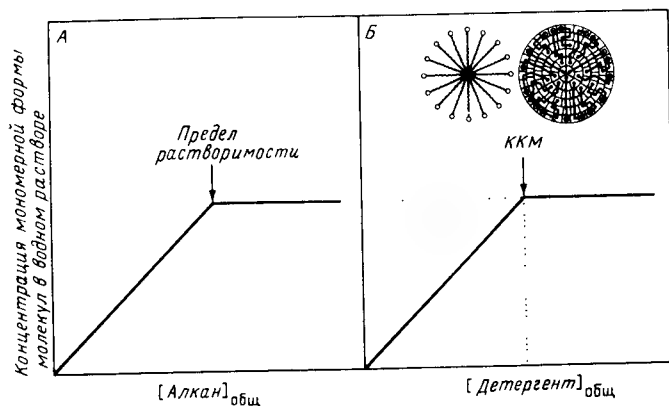


Рис. 2.17. Схема, иллюстрирующая аналогию между пределом растворимости и критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). Алканы растворяются в воде до определенной концентрации, при которой начинает образовываться отдельная фаза (А). Амфифильные соединения, каковыми являются детергенты, растворяются вплоть до точки, определяемой как ККМ, где начинают образовываться мицеллы (Б). На рис. Б схематически представлены два варианта поперечного сечения сферической мицеллы. Слева — обычное изображение мицеллы; оно не отражает реальности, поскольку в этом случае плотность вещества в центре мицеллы оказывается выше, чем по периферии, а цепи не могут упаковываться подобным образом. Справа — изображение, основанное на статистических данных о состоянии цепей [336]; оно более адекватно реальной упаковке углеводородных цепей в мицелле.

часть молекулы контактировала с водой, а ее неполярная область была исключена из такого контакта. Концентрация, при которой 50% детергента находятся в составе мицелл, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). С практической точки зрения удобнее определять ККМ как концентрацию, при которой начинают образовываться мицеллы. ККМ соответствует пределу растворимости молекул в мономерном состоянии. Дальнейшее добавление додецилсульфата приводит к увеличению концентрации мицелл.

Липидные агрегаты или мицеллы могут иметь разные размеры и форму. Так, додецилсульфат образует в воде сферические мицеллы, содержащие около 60 молекул на мицеллу. Некоторые детергенты и амфифильные молекулы могут образовывать как глобулярные, так и цилиндрические агрегаты. Фосфолипиды спонтанно агрегируют с образованием бислоев, которые по сути представляют собой своеобразную разновидность мицелл. Причины, по которым природные фосфолипиды образуют стабильные бислои, будут рассмотрены в следующем разделе. А здесь мы проведем количественный анализ связи между гидрофобностью и ККМ.

Водный раствор амфифильного соединения может состоять из смеси разных форм, включая момеры ($N = 1$) и различные агрегаты из большого числа молекул. В равновесии химический потенциал амфифильного соединения в каждой из форм будет одинаковым [683, 682]:

$$\mu_N = \mu_N^0 + \frac{kT}{N} \ln(X_N/N) = \text{Константа, одинаковая для всех } N, \quad (2.3)$$

где μ_N — стандартный химический потенциал агрегатов, содержащих N молекул, X_N — мольная доля амфифильных молекул в агрегатах, содержащих N молекул, k — константа Больцмана, T — температура. Для простоты рассмотрим моодисперсную систему с M молекулами на один агрегат. Это означает, что есть только один тип агрегатов с $N = M$, находящихся в равновесии с мономером. Хотя это и явное упрощение, но оно вполне приемлемо для молекул, образующих сферические мицеллы или небольшие мономеллярные везикулы. Теперь рассмотрим условия равновесия системы при критической концентрации мицеллообразования и представим ККМ как такую концентрацию, при которой $X_1 = X_M (\equiv X_{\text{ККМ}})$:

$$\mu_1 = \mu_M,$$

$$\mu_1^0 + kT \ln(X_{\text{ККМ}}) = \mu_M^0 + \frac{kT}{M} \ln(X_{\text{ККМ}}/M),$$

или

$$\Delta G_{\text{миц}}^0 = (\mu_M^0 - \mu_1^0) \cong kT \ln(X_{\text{ККМ}}). \quad (2.4)$$

Основной вклад в величину $\Delta G_{\text{миц}}^0$ дает свободная энергия гидрофобного переноса за счет вытеснения воды из неполярных областей амфифильных агрегатов при формировании мицеллы. Обратите внимание, что более отрицательные величины $\Delta G_{\text{миц}}^0$ соответствуют меньшим значениям $X_{\text{ККМ}}$, т. е. очень гидрофобные молекулы стремятся агрегировать при более низких концентрациях. Фактически для простых амфифильных молекул с одной углеводородной цепью, как в случае алкилсульфатов (например, додецилсульфата), зависимость $\Delta G_{\text{миц}}^0$ от длины цепи очень близка к зависимости $\Delta G_{\text{перенос}}^0$ для алкильных цепей от их длины [уравнение (2.2)]. С точки зрения термодинамики перенос неполярных групп из воды в жидкий углеводород аналогичен их переносу во внутреннюю гидрофобную область мицеллы. Количественно это выражается в том, что при каждом увеличении длины цепи на два метиленовых звена ККМ уменьшается примерно на порядок.

В случае мембран это означает, что для природных фосфолипидов, которые обычно имеют две длинные алкильные цепи на молекулу, гидрофобная составляющая $\Delta G_{\text{миц}}^0$ очень сильно благоприятствует их переходу в агрегированное состояние (бислои). Величина

ККМ для таких липидов составляет $<10^{-10}$ М. Другими словами, в большинстве случаев концентрация мономерных фосфолипидов, находящихся в равновесии с мембраной, пренебрежимо мала. Поэтому для связывания и переноса мономерных форм липидов внутри клетки или между клетками природа создала специальные белки. Они будут рассмотрены в гл. 10.

2.3.3. ФОРМА МИЦЕЛЛ: ПОЧЕМУ ОБРАЗУЕТСЯ БИСЛОЙ?

В предыдущем разделе было показано, что в водном растворе природные фосфолипиды самопроизвольно агрегируют. Чем же определяется форма мицелл? Следует напомнить, что некоторые природные липиды, например фосфатидилэтаноламин с ненасыщенными жирнокислотными цепями, не образуют стабильных бислоев при диспергировании в воде. Чтобы выяснить механизмы, лежащие в основе стабильности бислоя, и понять, почему некоторые мембранные компоненты способствуют формированию небислойных структур, необходимо более глубоко рассмотреть термодинамику этих систем и обсудить, как форма липидных молекул влияет на их упаковку в мицеллах. Читатели, интересующиеся лишь качественной стороной проблемы, могут опустить этот раздел и сразу перейти к следующему.

Почему мембранные фосфолипиды не образуют глобулярных мицелл? При обсуждении вопроса об упаковке амфифильных молекул в мицеллах определенной геометрии (например, сферических) следует рассмотреть стерические требования к упаковке с двух точек зрения. Неполарная часть молекулы характеризуется определенным молекулярным объемом (v) и максимальной длиной этого участка [605]. Без учета других характеристик эти два параметра будут определять максимальный радиус сферической мицеллы, а также число молекул, входящих в мицеллу. Другой параметр, который следует принять во внимание, — это оптимальная площадь поверхности, занимаемой полярной головкой (S_0). У природных фосфолипидов площадь, приходящаяся на молекулу в некоей сферической мицелле, будет намного больше, чем требуется для оптимальной упаковки головок, и эти амфифильные соединения не образуют стабильных сферических мицелл. Мы сначала оценим факторы, которые определяют *оптимальную площадь поверхности на молекулу* для амфифильных веществ на поверхности мицеллы, а затем посмотрим, как величина этой площади отражается на *критическом параметре упаковки*, который определяет, какая форма мицелл является более предпочтительной для того или иного амфифильного соединения.

Оптимальная площадь поверхности, приходящаяся на молекулу

Теоретически распределение липидов между различными агрегированными структурами (например, сферическими мицеллами, бислоями, цилиндрическими мицеллами и т. п.) определяется химическим потенциалом стандартного состояния (или средней свободной энергией) молекул в каждой структуре, μ_N^0 . Чтобы продолжить рассмотрение, необходимо раскрыть смысл параметра μ_N^0 с учетом геометрии мицелл. Следуя представлениям Израелашвили и др. [683, 682], примем, что величина химического потенциала молекулы, имеющей среднюю площадь поверхности S и находящейся в составе мицеллы с параметром агрегации N , имеет три составляющие. Именно зависимость μ_N^0 от средней площади, приходящейся на молекулу, позволяет объяснить геометрическую форму мицелл:

$$\mu_N^0 = \gamma S + \frac{C}{S} + \frac{H_N}{3}. \quad (2.5)$$

Слагаемые 1 и 2 отражают вклад сил притяжения и отталкивания на поверхности мицеллы, а слагаемое 3 представляет собой суммарную энергетическую составляющую, относящуюся к объемной фазе мицеллы. Физический смысл этих составляющих нетрудно понять. H_N (слагаемое 3) — это свободная энергия, связанная с алкильными цепями. В первом приближении она одинакова для всех мицелл, в которых алкильные цепи изолированы от воды и образуют углеводородоподобную фазу. Этот член, а точнее величина $(H_N - H_1)$, зависит от длины цепи неполярной части молекулы и тем самым определяет ККМ. Таким образом, величина $(H_N - H_1)$ является мерой гидрофобности.

Слагаемые 1 и 2 отражают энергетический вклад межмолекулярных взаимодействий на границе раздела вода—углеводород. Их величина зависит от плотности упаковки липидных молекул в мицелле, а следовательно, от формы мицеллы. Наиболее благоприятна такая форма, которая минимизирует свободную энергию системы. Попытаемся понять это (по крайней мере качественно), исходя из следующих простых термодинамических представлений.

Слагаемое 1: γS , поверхностное натяжение на границе раздела фаз. Этот член, отражающий силы притяжения, эквивалентен поверхностному натяжению, стабилизирующему границу раздела жидкость—жидкость в системах вода—углеводород. γ — это коэффициент поверхностного натяжения; он имеет размерность энергии в расчете на 1 см^2 и обычно равен примерно 50 эрг/см^2 . Эта величина эквивалентна работе, совершаемой при изменении площади поверхности на 1 см^2 при поверхностном давлении 50 дин/см . Поверхностное натяжение можно также рассматривать как «отрицательное давление», возникающее за счет различных сил межмолеку-

лярного притяжения на границе раздела фаз. В этом случае оно имеет размерность дин/см и составляет около 50 дин/см.

Слагаемое 2: C/S , силы межмолекулярного отталкивания. В первом приближении их можно представить как сумму всех сил отталкивания на границе раздела фаз, включая электростатические и стерические. Главной особенностью этого члена является то, что все входящие в него силы отталкивания обратно пропорциональны средней площади, приходящейся на молекулу на гидрофобной поверхности мицелл. Другими словами, чем плотнее упакованы молекулы (малая площадь на молекулу), тем сильнее становятся эти взаимодействия и тем неблагоприятнее их влияние.

Эти два слагаемых лежат в основе предложенного Тэнфордом принципа действия противоположных сил [1432]. Стремлению молекул к ассоциации противодействуют силы отталкивания, объединенные константой C , что в конечном счете определяет оптимальную упаковку молекул в бислое.

Величину S , отвечающую оптимальной упаковке, можно получить, положив $d\mu_N^0/dS = 0$, т. е. минимизировав свободную энергию по площади поверхности, приходящейся на молекулу. Это дает

$$S_0 = \sqrt{C/\gamma}. \quad (2.6)$$

Даже при таком сверхупрощенном рассмотрении видно, что S_0 задается молекулярной константой C . Например, можно ожидать, что для додецилсульфата будет иметь место сильное электростатическое отталкивание между заряженными сульфатными группами на поверхности мицеллы (что соответствует высоким значениям C), и это приведет к большим значениям S_0 , особенно при низкой ионной силе. И в самом деле, полярная головка этой молекулы занимает большую площадь на поверхности мицеллы, удерживая группы на достаточном удалении друг от друга. Это взаимодействие и определяет сферическую форму мицелл додецилсульфата. Чтобы убедиться в этом, проведем следующее рассмотрение.

Геометрия мицелл и критический параметр упаковки

Говоря о наиболее стабильной геометрии мицелл, следует принять во внимание три молекулярных параметра.

1. S_0 , оптимальная площадь поверхности, занимаемой молекулой на гидрофобной поверхности раздела. Она частично зависит от свойств раствора, особенно ионной силы в случае заряженных молекул.

2. l , максимальная длина алкильной цепи в простых амфифильных молекулах с одной цепью и в фосфолипидах. Она определяет

верхний предел размера мицелл, например радиус сферической мицеллы или толщину бислоя. Обратите внимание, что мицеллы никогда не имеют полостей или дырок, поэтому радиус сферической мицеллы не может превышать l , хотя и может быть меньше этой величины. Обычно он несколько меньше длины максимально вытянутой цепи, имеющей полностью-*транс*-конфигурацию.

3. v , молекулярный объем углеводородной области амфифильной молекулы. Объем мицеллы, ограничиваемый границей раздела фаз углеводород—вода, считают равным Mv , где M — число молекул в мицелле.

Площадь поверхности, приходящейся на единицу объема, зависит от геометрии мицеллы, и именно этим в конечном счете определяется, какие мицеллы образуются различными амфифильными соединениями. Рассмотрим некоторые возможные формы мицелл.

1. **Сферы.** Если размер определяется длиной углеводородной цепи, то из всех возможных структур сфера имеет наибольшее отношение поверхности к объему; к образованию мицелл такой формы особенно склонны липиды с большой величиной S_0 , такие, как додецилсульфат.

2. **Деформированные сферы.** Для них характерно меньшее значение отношения поверхность/объем, чем для сфер:

а) **эллипсоиды:** по-видимому, их образование маловероятно [682], поскольку на некоторых участках поверхности (например, по краям сплющенного эллипсоида) упаковка молекул в высшей степени невыгодна;

б) **глобулы:** состоят как бы из двух слившихся сфер. Их образование считается весьма вероятным [682].

3. **Стержни и цилиндры.** Характеризуются еще более низким отношением поверхность/объем. По краям, по-видимому, имеют закругления в виде полусфер, позволяющие устранить контактирование воды с неполярной областью при сохранении приемлемой упаковки молекул.

4. **Бислои.** Имеет наименьшее отношение поверхность/объем; легче всего его образуют липиды с большим молекулярным объемом (например, липиды с двумя алкильными цепями). Обратите внимание, что диски и плоские фрагменты бислоя энергетически весьма невыгодны из-за контактирования их краев с водой. При замыкании бислоя в сферические везикулы (липосомы) этот краевой контакт устраняется. Замыканию благоприятствует и энтропийный фактор, поскольку при этом образуются частицы меньших размеров, чем протяженные плоские фрагменты бислоя. Однако некоторые белки и пептиды стабилизируют фосфолипидные диски (гл. 3).

Зная параметр v/lS_0 , можно предсказать, какие мицеллы будут преимущественно образовываться теми или иными молекулами. Этот параметр называется *критическим параметром упаковки* и

зависит от объема и длины неполярного участка молекулы, а также от оптимальной площади поверхности полярной головки.

Рассмотрим, например, сферическую мицеллу радиусом R , содержащую M молекул.

$$\begin{aligned}\text{Полная поверхность мицеллы} &= MS_0 = 4\pi R^2, \\ \text{Полный объем мицеллы} &= Mv = (4/3)\pi R^3,\end{aligned}$$

так что радиус мицеллы

$$R = \frac{3v}{S_0}.$$

Поскольку радиус мицеллы не может быть больше l ($R \leq l$) — максимально возможной длины углеводородной цепи липидной молекулы, то условие упаковки липидов в сферические мицеллы будет выглядеть как

$$\frac{v}{lS_0} \leq 1/3. \quad (2.7)$$

Аналогичные расчеты легко провести также для мицелл цилиндрической формы и для плоского бислоя. Критические параметры в этом случае будут равны

$$\text{Цилиндр: } (v/lS_0) = 1/2, \quad (2.8a)$$

$$\text{Бислой: } (v/lS_0) = 1. \quad (2.8b)$$

Отсюда следует, что при заданных v , l и S_0 , если величина $(v/lS_0) < 1/3$, то будут образовываться сферические мицеллы, если $1/3 < v/lS_0 < 1/2$, то мицеллы будут глобулярными или цилиндрическими, а если $1/2 < v/lS_0 < 1$, то липиды будут образовывать стабильный бислой. Наличие двух длинных ацильных цепей в природных фосфолипидах увеличивает объемную составляющую (молекулярный объем v), именно это и приводит к формированию стабильного бислоя. У фосфолипидов с одной цепью, какими являются большинство синтетических детергентов, параметр v/lS_0 лежит между $1/3$ и $1/2$, поэтому они не образуют стабильных бислоев. По тем же причинам не образуют стабильных бислоев диацильные фосфолипиды с очень короткими цепями (например, с $n = 6$).

Особый интерес представляет случай, когда природные липиды характеризуются параметром $v/lS_0 > 1$ и, следовательно, не образуют стабильных бислоев. Эти липиды, имеющие относительно небольшие полярные головки, как мы уже видели, формируют обращенную гексагональную фазу (H_{II}). Их роль в биологических мембранах неясна, хотя и служит предметом активного обсуждения [263, 1041, 533, 303, 267].

2.3.4. ФОРМА ЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ

Итак, мы начали с рассмотрения термодинамических аспектов агрегации липидов. Однако ясно, что качественный анализ можно провести, проанализировав способы упаковки различных липидов с учетом геометрической формы их молекул. Это четко видно при сопоставлении общей формы липидных молекул, в частности при сравнении площади поперечного сечения углеводородного участка молекулы, примерно равной v/l , с оптимальной площадью поверхности, необходимой для размещения полярной головки S_0 . Такой подход мы использовали, когда анализировали различия в характере упаковки фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина в кристаллах и в фазе геля бислоя (см. разд. 2.1, 2.2). Упрощенно липидные молекулы можно представить в виде конусов, цилиндров или перевернутых конусов в зависимости от соотношения между этими двумя величинами. На рис. 2.18 схематично показаны все эти формы и приведены конкретные примеры. Конечно, это — образное

Липид	Фаза	Форма молекулы	Критический параметр упаковки (v/lS_0)
Лизофосфолипиды Детергенты	 Мицеллярная	 Перевернутый конус	$< 1/3$ (Сфера) От $1/3$ до $1/2$ (Глобулярные структуры; стержни)
Фосфатидилхолин Сфингомелин Фосфатидилсерин Фосфатидилинозитол Фосфатидилглицерол Фосфатидная кислота Кардиолипин Дигалактозилдиглицерид	 Бислойная	 Цилиндр	От $1/2$ до 1
Фосфатидилэтаноламин (ненасыщенный) Кардиолипин - Ca^{2+} Фосфатидная кислота - Ca^{2+} ($\text{pH} < 6,0$) Фосфатидная кислота ($\text{pH} < 3,0$) Фосфатидилсерин ($\text{pH} < 4,0$) Моногалактозилдиглицерид	 Гексагональная (H_{II})	 Конус	1

Рис. 2.18. Полиморфные фазы, форма молекул и критический параметр упаковки для некоторых мембранных липидов [263]. Рисунок любезно предоставили д-р Р. Cullis и д-р М. Норе.

представление результатов термодинамического анализа, проведенного в предыдущих разделах, но оно позволяет легко осмыслить хотя бы на качественном уровне большой массив экспериментальных данных. На основе простого рассмотрения формы липидных молекул можно понять роль отдельных липидов в бислое, например в отношении стабилизации участков мембраны с большой кривизной и упаковки молекул вокруг мембранных белков [263, 1041, 533, 303, 267].

2.4. Фазовые переходы в липидных системах

Термодинамика фазовых переходов в липидных системах изучалась во многих экспериментальных [829] и теоретических [1048, 1163, 1008] работах. Сами термодинамические параметры (например, температура перехода, ΔH^0 , ΔS^0) не несут структурной информации, однако они зависят от физико-химических свойств липидных молекул. Конечной целью этих исследований является количественное и качественное описание фазового состояния биологических мембран, в частности поведение фосфолипидов в бислое и влияние различных соединений (например, белков и холестерина), нарушающих структурную организацию мембран. Эта задача пока далека от своего решения, тем не менее удалось достичь значительных успехов в создании концепций и моделей, основанных на изучении простых систем, начиная с водных дисперсий гомогенных липидов и кончая бинарными смесями различных фосфолипидов с холестерином или с отдельными белками, встроенными в бислой. Следует, однако, иметь в виду, что, как правило, биологические мембраны не претерпевают фазовых переходов, поэтому большая часть материала, обсуждаемого в этом разделе, не относится прямо к биологическим мембранам. Однако основные физико-химические аспекты поведения липидов и липидно-белковых систем распространяются и на биологические мембраны, особенно если речь идет о возможной латеральной гетерогенности мембран (см. разд. 4.5) и о механизмах взаимодействия компонентов в бислое.

Лучше всего изучен фазовый переход липидов между ламеллярной гелевой и жидкокристаллической фазами. Кроме того, изучался переход между ламеллярной и обращенной гексагональной (H_{II}) фазами, а также между другими мезоморфными липидными структурами. В зависимости от природы изучаемого липида фазовые переходы можно индуцировать несколькими способами, например изменяя давление [215], температуру [1444, 1120], ионную силу или pH [194, 1467]. Чаше всего изучают температурные переходы, и не только потому, что они могут происходить в организмах, неспособ-

ных к терморегуляции (см. разд. 10.5), но и потому, что их относительно легко исследовать и с высокой точностью измерять соответствующие параметры. Так, были измерены теплоемкость и величина ΔH^0 . Эти параметры можно использовать при сравнении изучаемых объектов с теоретическими моделями. Для проведения таких измерений обычно применяют дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК).

2.4.1. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ КАЛОРИМЕТРИЯ (ДСК) [56, 949]

Этот метод позволяет получить исключительно важную информацию о термодинамике модельных и биологических мембран. С его помощью регистрируют и исследуют изменения фазового состояния липидов, а также характеризуют нарушения этого состояния при взаимодействии липидов с другими веществами (белками, ионами или малыми гидрофобными молекулами). При ДСК образец и инертный стандарт нагревают независимо, так чтобы их температура была одинаковой. При этом количество тепла, необходимого для эндотермического перехода бислоя из состояния геля в жидкокристаллическое состояние, превышает количество тепла, необходимого для поддержания стандарта при такой же температуре. Затем строят зависимость разности потоков тепла от температуры. С помощью высокочувствительных калориметров можно проводить измерения в разбавленных водных суспензиях липидов (1 мг/мл при общем объеме образца до 1 мл). Этим методом определяют обычно следующие параметры.

1. Температуру перехода T_c , соответствующую началу перехода.
2. Среднюю точку перехода T_m , соответствующую середине перехода.
3. Энтальпию перехода ΔH — количество тепла, необходимое для осуществления перехода в расчете на моль вещества или единицу массы.
4. Теплоемкость C_p — количество тепла (в расчете на грамм или на моль), необходимое для повышения температуры образца на один градус.

Дополнение 2.2. Средняя точка фазового перехода и его ширина

Для перехода между двумя состояниями T_m определяется как точка, в которой $\Delta G^0 = 0$:

$$\Delta G^0 = 0 = \Delta H^0 - T_m \Delta S^0, \\ T_m = \Delta H^0 / \Delta S^0. \quad (2.9)$$

Эти соотношения можно использовать для нахождения ΔS^0 , энтропии перехода, после измерения T_m и ΔH^0 .

Важным параметром является ширина перехода. Ее определяют по наклону графика Вант-Гоффа. Экспериментальные данные анализируют в рамках модели двух состояний (например, фазы геля и жидкокристаллической фазы) и по глубине перехода рассчитывают долю этих состояний при разной температуре. При T_m доля каждой из фаз по определению составляет 0,5. Константа равновесия K равна

$$K = \frac{\text{Доля жидкокристаллической фазы}}{\text{Доля гелевой фазы}}. \quad (2.10)$$

График Вант-Гоффа представляет собой зависимость $\ln K$ от $1/T$; из его наклона, равного $\Delta H_{\text{вн}}^0/R$, можно найти энтальпию перехода в кал/моль. Однако ее относят на моль кооперативной единицы, которая фактически претерпевает переход. Если липиды плавятся как ансамбль из 100 молекул, представляющий собой «кооперативную единицу», то $\Delta H_{\text{вн}}^0$ должна в 100 раз превышать «калориметрическое» значение $\Delta H_{\text{кал}}^0$, получаемое непосредственно из данных ДСК и отнесенное на моль липида.

Таким образом, плавлению большой кооперативной единицы или высококооперативному температурному фазовому переходу соответствует большой наклон графика Вант-Гоффа (большие $\Delta H_{\text{вн}}^0$). Чем меньше $\Delta H_{\text{вн}}^0$, тем шире (менее кооперативны) фазовые переходы.

Размер кооперативной единицы определяется по формуле

$$\text{Кооперативная единица} = \frac{\Delta H_{\text{вн}}^0}{\Delta H_{\text{кал}}^0}. \quad (2.11)$$

Основная проблема состоит в том, что уширение перехода может происходить и по ряду других причин, чаще всего из-за присутствия в липидном бислое очень небольшого количества примесей [16]. Однако обычно связывают изменение ширины перехода в липидном бислое при добавлении «пертурбантов» (например, белков или холестерина) с изменением характера межмолекулярных взаи-

модействий углеводородных цепей, приводящих к уменьшению размера кооперативной единицы. Часто добавление пертурбантов сопровождается снижением $\Delta H_{\text{кал}}^0$, что обычно объясняют некой «изоляцией» части липидных молекул и неучастием их в фазовом переходе основной массы липидов. Таким действием обладают некоторые мембранные белки (например, Ca^{2+} -АТРаза) [526].

На рис. 2.19 представлены кривые ДСК, полученные для некоторых фосфолипидов. Фазовым переходам между гелевой и жидкокристаллической фазами соответствует резкий скачок теплоемкости, происходящий в узком температурном интервале. Переход липида из гелевой фазы в жидкокристаллическую требует затрат тепла, и

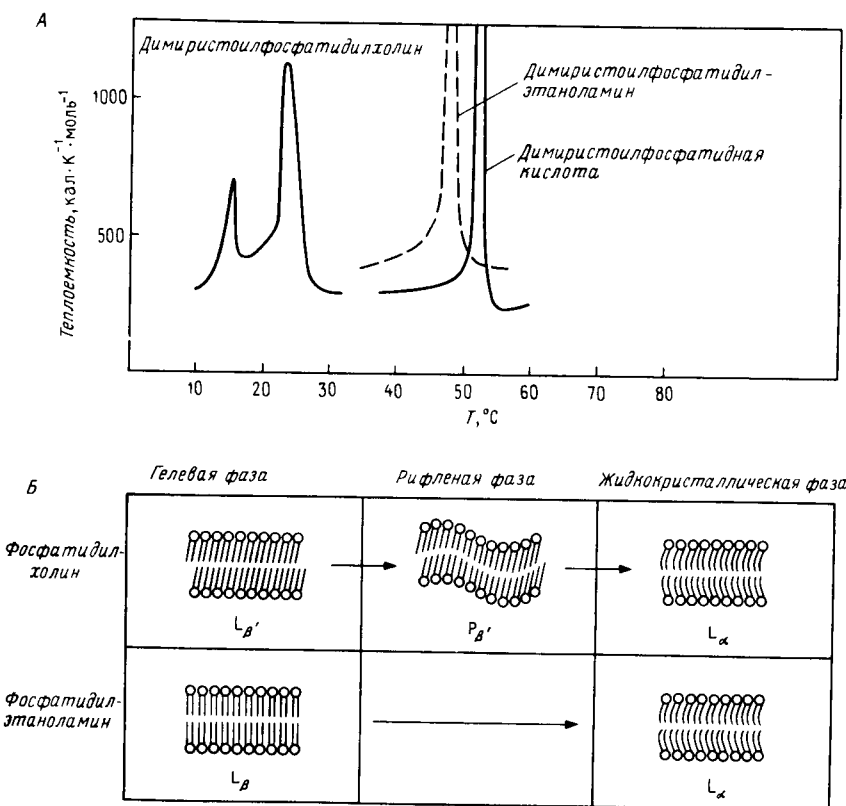


Рис. 2.19. А. Кривые ДСК для трех фосфолипидов [112]. Б. Зависимость молекулярной организации фосфатидилхолина и фосфатидилэтанолamina от температуры [112].

этот процесс нередко сравнивают с обычным плавлением, например с переходом лед—жидкая вода. Среднюю точку теплового перехода часто называют температурой плавления. Этот переход считается переходом первого рода, и теоретически он характеризуется бесконечной теплоемкостью при температуре перехода. На практике, однако, такие переходы часто совершаются в температурном интервале шириной в несколько градусов. Основной причиной уширения многих переходов в случае однокомпонентных липидных систем является присутствие небольших количеств примесей. Так, фазовый переход высокоочищенного дипальмитоилфосфатидилхолина является довольно резким, но он очень чувствителен к наличию примесей [16].

Температура плавления липидов определяется соотношением между целым рядом противодействующих факторов. С точки зрения энтропии разупорядоченные цепи в жидкокристаллическом состоянии, характеризующиеся наличием *гош*-конформеров, более выгодны, чем высокоупорядоченные цепи в гелевом состоянии, имеющие полностью-*транс*-конфигурацию. Однако в относительно более упорядоченной фазе геля создаются более благоприятные условия для вандерваальсовых взаимодействий. Кроме того, уменьшение площади поперечного сечения ацильных цепей в упорядоченном состоянии приводит к сближению соседних полярных головок. Такое сближение может быть выгодным с точки зрения образования межмолекулярных водородных связей или ионных связей между двухвалентными катионами металлов (например, Ca^{2+}) или неблагоприятным, если оно сопровождается стерическими взаимодействиями между объемистыми группами или электростатическим отталкиванием одноименно заряженных групп. В этих случаях сильное влияние на величину T_m того или иного липида могут оказать pH, ионная сила и присутствие двухвалентных катионов. По мере повышения температуры энтропийные эффекты в конечном счете становятся преобладающими, что приводит к стабилизации состояния с повышенным содержанием *гош*-ротамеров.

Изменения характера взаимодействия между полярными головками (например, при изменении ионной силы) влияют на T_m потому, что от них зависит ΔH^0 , а $T_m = \Delta H^0 / \Delta S^0$. Например, при повышении ионной силы ослабляется электростатическое отталкивание между фосфатными группами в бислоях фосфатидной кислоты. Однако этот эффект наиболее выражен в случае фазы геля, поскольку плотность полярных групп (т. е. плотность зарядов) в этой фазе выше, чем в жидкокристаллическом состоянии. Поэтому при повышении ионной силы наблюдается увеличение ΔH^0 и, следовательно, возрастает T_m . Таким образом, можно индуцировать фазовый переход в изотермических условиях, изменяя ионную силу или другие параметры, которые влияют на взаимодействия полярных групп [194].

Таблица 2.1. Термодинамические параметры температурного фазового перехода в насыщенных диацилфосфатидилхолинах (по данным ДСК)¹⁾

Липид	T_{m1} , °C	T_{m2} , °C	ΔH_1 , ккал/моль	ΔH_2 , ккал/моль	ΔS_2 , кал/К·моль
ДМФХ (C_{14})	15,3	24,0	1,3	6,5	21,9
ДПФХ (C_{16})	35,5	41,5	1,6	8,7	27,7
ДСФХ (C_{18})	51,0	54,3	1,8	10,4	33,3
ДАФХ (C_{20})	62,1	64,1	1,7	12,3	37,6

¹⁾ Из работы [112]. Сокращения: ДМФХ — димиристоилфосфатидилхолин, ДПФХ — дипальмитоилфосфатидилхолин, ДСФХ — дистеароилфосфатидилхолин, ДАФХ — днарадиоилфосфатидилхолин. Индексы 1 и 2 относятся к предпереходу и основному переходу соответственно.

В табл. 2.1 и на рис. 2.20 приведены данные, полученные для однокомпонентных фосфолипидных систем, на основании которых можно высказать некоторые качественные соображения.

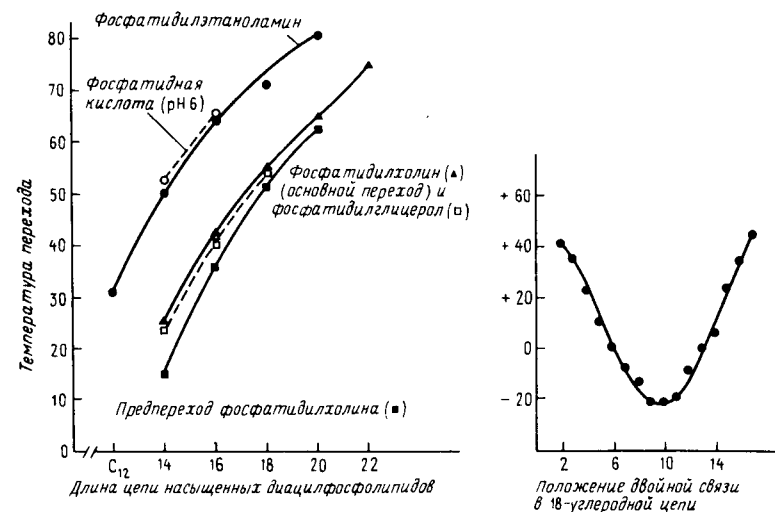


Рис. 2.20. Зависимость температуры фазового перехода от длины цепи в насыщенных диацилфосфолипидах и от положения *цис*-двойной связи в мононенасыщенных 1,2-ди(цис-октадеценил)фосфатидилхолинах [112, 73, 698]. При pH 12 фосфатидная кислота имеет такую же температуру перехода, как и фосфатидилхолин и фосфатидилглицерол с такой же длиной цепи.

1. Температура фазового перехода сильно зависит от особенностей жирнокислотных цепей, поскольку относительная стабильность гелевой и жидкокристаллической фаз определяется силой вандерваальсовых взаимодействий:

- а) чем длиннее цепи, тем выше T_m , поскольку сила вандерваальсовых взаимодействий увеличивается с удлинением цепей;
- б) наличие *транс*-двойных связей снижает T_m , поскольку они нарушают оптимальные взаимодействия цепей в гелевом состоянии;
- в) *цис*-двойные связи оказывают еще больший эффект, зависящий от положения двойной связи в цепи; максимальный эффект наблюдается, когда *цис*-двойная связь находится в середине цепи. Прокариоты отличаются большим структурным разнообразием углеводородных цепей, которые содержат такие заместители, как циклопропановые и метильные группы. Это приводит к дестабилизации гелевого состояния и снижению T_m [1262] (см. гл. 1);
- г) фтор, которым часто заменяют водород в фосфолипидах с целью введения ЯМР-метки, оказывает на T_m такое же влияние, как и *цис*-двойная связь.

2. У липидов с большой площадью поверхности, занимаемой полярной головкой (например, у фосфатидилхолина), наблюдается предпереход между двумя гелевыми состояниями ($L_{\beta'}$ и $P_{\beta'}$) [855]. Эти состояния и изгибание цепей у таких липидов были рассмотрены в разд. 2.2.

3. Температура плавления насыщенных фосфатидилэтаноламинов примерно на 20° выше, чем соответствующих фосфатидилхолинов, вероятно, благодаря стабилизации гелевого состояния фосфатидилэтаноламина с помощью водородных связей [115].

4. Введение *цис*-двойной связи в жирнокислотные цепи в значительной мере уменьшает различия в T_m между фосфатидилэтаноламином и фосфатидилхолином.

5. Фосфолипиды с различными полярными головками (в частности, кардиолипин) претерпевают такие же фазовые превращения, как и гликолипиды.

6. Заряженные липиды очень чувствительны к ионной силе, pH (если липид имеет pK в исследуемом диапазоне pH) и присутствию двухвалентных катионов [194]. Связывание ионов с фосфолипидами обсуждается в гл. 7.

7. Фазовые переходы в фосфолипидах зависят также от давления. При повышении давления фаза геля стабилизуется и, например, для фосфатидилхолина T_m повышается на 22 °C/кбар [215]. Стабилизация гелевой фазы при повышении давления происходит потому, что она является более плотной, чем жидкокристаллическая.

8. При T_m гелевая и жидкокристаллическая фазы сосуществуют. Экспериментально это проявляется в повышении проницаемости везикул в момент фазового перехода. Диаметр образующихся при этом флуктуирующих «пор» в многослойных липосомах достигает 18 Å [1489]. Поры можно представить как дефекты упаковки на границе между гелевыми и жидкокристаллическими доменами бислоя. Роль таких «дефектов» в слиянии мембран обсуждается в гл. 9.

9. Для малых везикул, как правило, характерен широкий термотропный переход; по-видимому, это связано с ограничениями, налагаемыми на упаковку липидов в бислое, находящемся в фазе геля, с малым радиусом кривизны.

В заключение следует отметить, что есть много теоретических подходов к анализу фазовых переходов в липидных бислоях [1048, 1163, 1008]. Наиболее популярные модели исходят из предположения о том, что состояние сегментов цепи может быть описано с помощью соотношения *транс*- и *гош*-ротамеров (g^+ или g^-). Принимая во внимание, что при сближении фрагментов цепей происходит их взаимное отталкивание как несжимаемых сфер, а при удалении — притяжение, «плавление» фосфолипидного бислоя можно адекватно представить как увеличение доли *гош*-конформеров. Подобный подход может быть распространен с определенными оговорками и на описание поведения бинарных липидных смесей [1008].

2.4.2. ЛИПИДНЫЕ СМЕСИ

Следующей по уровню сложности вслед за индивидуальными липидами является бинарная смесь липидов. Термодинамические и структурные свойства таких смесей ближе к свойствам биологических мембран, и их изучение позволяет получить информацию о смешиваемости липидов разного типа. Особый интерес представляет вопрос, могут ли липидные смеси, характерные для биологических мембран, спонтанно образовывать домены разного состава, обладающие разными физическими и химическими свойствами. Эта идея о латеральном разделении фаз в биологических мембранах (см. разд. 4.5.4), еще не нашедшая убедительного экспериментального подтверждения, вытекает из результатов физико-химических исследований индивидуальных липидов и их смесей, где такое фазовое разделение было наглядно продемонстрировано (см., например, [783]).

Как и при рассмотрении фазового перехода индивидуальных липидов, бинарные липидные смеси можно исследовать в рамках обычной теории растворов [829, 830]. Такой подход оказался наибо-

лее успешным применительно к смесям разнородных фосфолипидов.

Смеси фосфолипидов

Термодинамические исследования четко показали, что разнородные фосфолипиды не образуют идеальных смесей. Стерические ограничения, возникающие в фазе геля, могут затруднить смешивание двух липидов и привести к их кластеризации или латеральному фазовому разделению. Даже в жидкокристаллической фазе два липида, смешиваясь друг с другом, часто дают неидеальную смесь. Это означает, что взаимодействия между однотипными липидами отличаются от такового для разнородных липидов, и в результате происходит отбор ближайшего окружения липидных молекул.

Неидеальность липидных смесей выявляется при сравнении экспериментальной фазовой диаграммы с теоретической диаграммой,

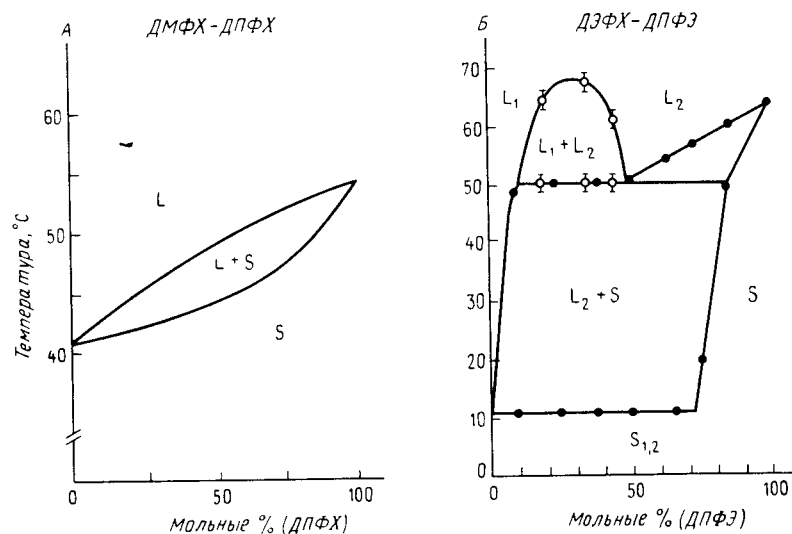


Рис. 2.21. Типичные фазовые диаграммы для двухкомпонентных фосфолипидных смесей [644]. Обозначения L, L₁ и L₂ относятся к жидкокристаллическим фазам. S — это твердая или гелевая фаза. На диаграмме A липиды мало различаются по длине цепи и полностью смешиваются как в гелевой, так и в жидкокристаллической фазах. На диаграмме B липиды значительно различаются по длине цепи и не смешиваются как в гелевой, так и в жидкокристаллической фазах. Обозначения: ДМФХ — димиристоилфосфатидилхолин, ДПФХ — дипальмитоилфосфатидилхолин, ДЭФХ — диэладоилфосфатидилхолин (18:1, *транс*-9), ДПФЭ — дипальмитоилфосфатидилэтанолламин.

получаемой в рамках обычной теории растворов. Для построения экспериментальной фазовой диаграммы часто используют метод ДСК, следя за переходом липида из фазы геля в жидкокристаллическую фазу. Однако можно использовать любой другой метод, который позволяет определить долю липидов в каждой фазе. Для смесей липидов характерен гораздо более широкий температурный переход, чем для однокомпонентных систем. При построении фазовой диаграммы (рис. 2.21, A) регистрируют температуру, при которой начинается и заканчивается плавление смесей различного состава. В области между линиями, соединяющими температуры начала и окончания плавления, липид находится в частично расплавленном состоянии; здесь сосуществуют жидкокристаллические (жидкие) и гелевые (твердые) домены. Форма этих граничных линий зависит от термодинамических параметров, характеризующих плавление отдельных компонентов смеси, и от степени смешивания этих двух компонентов. В идеальном случае энтальпия и энтропия смешивания двух липидов равны нулю. Уравнения, описывающие неидеальные системы, сравнительно легко вывести ([829, 830]), предположив, что свободная энергия смешивания отличается от таковой для идеальных систем, и сравнив теоретические и экспериментальные фазовые диаграммы. Для смеси димиристоил- и дипальмитоилфосфатидилхолина экспериментальные данные достаточно хорошо соответствуют кривой, полученной исходя из предположения о неидеальном смешивании ($\Delta H_{\text{смешив}}^0 \neq 0$) этих двух липидов в гелевой фазе при условии их идеального смешивания в жидкокристаллической фазе. Эти липиды различаются только на две метиленовые группы. Смеси менее сходных липидов еще дальше от идеальных. Например, смеси дилауроил- и дистеароилфосфатидилхолинов (C₁₂ и C₁₈), по-видимому, отличаются от идеальных как в гелевой, так и в кристаллической фазах. Димиристоил- и дистеароилфосфатидилхолины (C₁₄ и C₁₈) почти не смешиваются в гелевой фазе [1587], а димиристоил- и диэладоилфосфатидилхолины (C₁₄ и C_{18:1, транс}) в этой фазе не смешиваются вообще.

Поведение смесей, содержащих в качестве одного из компонентов отрицательно заряженный липид, очень сильно зависит от присутствия двухвалентных катионов, например Ca²⁺. Эти катионы образуют межмолекулярные мостики, что приводит к кластеризации и латеральному разделению отрицательно заряженных липидов. Такое разделение можно зарегистрировать методом ДСК по появлению четких переходов, связанных с плавлением отдельных липидных компонентов (см., например, [1458]). Явление кластеризации можно прямо наблюдать и с помощью флуоресцентной микроскопии [607].

В заключение можно сказать, что смеси фосфолипидов, как и следовало ожидать, являются неидеальными системами как в геле-

вой, так и в жидкокристаллической фазах. Какое значение имеют исследования модельных липидных смесей для изучения распределения липидов в природных мембранах, пока неясно.

Фосфолипиды и холестерол

Взаимодействия между холестеролом и фосфолипидами явились предметом активных исследований. В большинстве работ в качестве фосфолипида использовался фосфатидилхолин, но изучались и другие липиды — фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин [398]. В том, что касается феноменологического описания смесей холестерол—фосфолипид, результаты проведенных исследований согласуются между собой, однако интерпретация полученных данных в рамках той или иной структурной модели различается. По данным рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов молекулы холестерола располагаются в бислое перпендикулярно его поверхности, причем ОН-группа находится вблизи сложноэфирных карбонильных групп фосфолипида [1606] (рис. 2.22). Однако спектроскопия КР не подтверждает образования водородных связей между этими группировками [171]. По данным ^2H -ЯМР присутствие холестерола сильно влияет на профиль параметра упорядоченности вдоль липидной

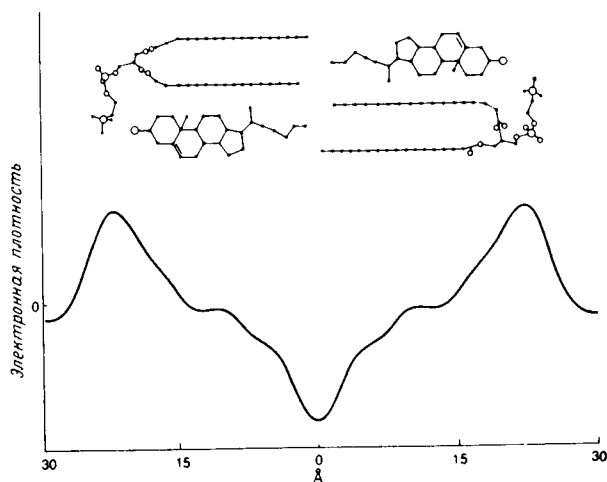


Рис. 2.22. Профиль электронной плотности гидратированного бислоя из яичного фосфатидилхолина и холестерола, полученный по данным дифракции рентгеновских лучей [461]. Приведена также согласующаяся с этими данными молекулярная модель.

углеводородной цепи [1092] и на его изменение при фазовом переходе фосфолипидов [890]. Данные фурье-ИК-спектроскопии (см. [250]) показывают, что выше T_m в присутствии холестерола доля *gauche*-ротамеров в углеводородных цепях фосфолипидных молекул уменьшается, а ниже T_m наблюдается обратный эффект. Упорядочивание связано с ограничениями при упаковке углеводородных цепей вблизи жесткого стерольного ядра. В жидкокристаллическом состоянии холестерол ограничивает конформационную подвижность фосфолипидных цепей, а в состоянии геля он затрудняет оптимальную упаковку цепей в полностью-*транс*-конфигурации. В результате смеси фосфолипид—холестерол занимают по упорядоченности промежуточное положение между гелевым и жидкокристаллическим состояниями чистого фосфолипида. По сути холестерол играет роль своеобразного «наполнителя», снижая силы притяжения между углеводородными цепями липидов. В то же время на полярные головки фосфолипидных молекул он оказывает слабое влияние.

Самый главный вопрос, касающийся биологических мембран, состоит в том, как распределен в них холестерол — хаотично или в виде кластеров. Изучение модельных систем не дало четкого ответа на этот вопрос, однако оно показало, что смеси фосфолипид—холестерол ведут себя не идеально, как этого следовало ожидать при хаотичном распределении компонентов. Результаты исследования смесей холестерола с дипальмитоилфосфатидилхолином методом ДСК свидетельствуют о наличии двух отдельных фаз, когда содержание холестерола не превышает 20 мол.%, и одной фазы при содержании холестерола в интервале между 20 и 50% [890]. При концентрации холестерола выше 50% фазовый переход вообще не наблюдается, поскольку холестерол полностью устраняет кооперативные взаимодействия между липидными углеводородными цепями. По данным других физических методов в смесях с содержанием холестерола около 20, 33 и 50% имеется несколько фазовых границ [839]. Структурная организация каждой фазы неизвестна. Если судить по результатам электронно-микроскопических исследований образцов, полученных методом замораживания—скалывания [242], то можно предположить, что в диапазоне концентраций холестерола 0—20% в смеси с дипальмитоилфосфатидилхолином происходит чередование полос чистого фосфолипида и смеси, содержащий 20% холестерола, т. е. образуется рифленая структура. Возможно, на самом деле существуют стабильные молекулярные комплексы фосфолипид—холестерол, но четкие доказательства этого отсутствуют. По некоторым данным холестерол проявляет определенное сродство к отдельным фосфолипидам [1557]. Как показывают результаты опытов по рассеянию нейтронов [765], выше точки фазового перехода (35 °C) холестерол и димристоилфосфатидилхолин полностью смешиваются друг с другом, а ниже границы фазового

перехода смеси (7 °C) они образуют несколько отдельных фаз. Теоретические модели, не учитывающие специфических межмолекулярных взаимодействий [1163], помогли лишь частично понять механизм влияния холестерина на параметры липидных фазовых переходов (T_m и ΔH^0).

Подводя итоги, можно сказать, что смеси холестерол—липиды — это сложные и полиморфные системы, в которых при определенных условиях существует латеральное разделение фаз. В какой мере все сказанное можно отнести к холестеролу в биологических мембранах, пока неясно (см. разд. 10.4).

Другие смеси

В работе [829] исследовалось влияние на термотропные свойства мембранных липидов многочисленных гидрофобных соединений. К таким соединениям относятся различные лекарственные препараты, анестетики, углеводороды, спирты и жирные кислоты, а также природные мембранные компоненты, такие, как каротиноиды и полиизопреноиды (долихол, бактопренол, убихинон). Вещества, плохо смешивающиеся с фосфолипидами, оказывают меньшее влияние на их фазовый переход в бислое. Это может быть связано с тем, что они даже в жидкокристаллическом состоянии образуют отдельную фазу внутри бислоя либо просто включаются в бислои в слишком малом количестве. Например, эфиры холестерола уже при концентрации в несколько процентов не смешиваются с липидами в ламеллярной фазе [1453]. Физико-химические исследования локализации убихинона в бислое не дали однозначных результатов, поскольку неясно, в какой степени этот хинон погружен в липидный бислой (см., например, [1477, 1391]). Одни соединения, например полиизопреноиды, при введении в липиды приводят к снижению T_m , затрудняя эффективную упаковку липидов в гелевой фазе [1477, 1516, 809], другие же, например высшие жирные кислоты и спирты, напротив, вызывают возрастание T_m [889]. Некоторые малые гидрофобные молекулы, такие, как углеводороды с короткой цепью, по-видимому, образуют в бислое отдельную фазу и понижают T_m [950].

2.5. Модельные мембранные системы

Для изучения свойств индивидуальных липидов, липидных смесей и реконструированных липидно-белковых систем были созданы многочисленные модельные мембранные системы. Их можно раз-

делять на три типа: 1) монослои; 2) плоские бислои; 3) липосомы и везикулы. Каждая из этих систем и многие их разновидности имеют свои достоинства и недостатки, однако получаемая с их помощью информация оказалась весьма ценной при разработке концепций, связанных с изучением биологических мембран. В этом разделе мы вкратце рассмотрим некоторые из модельных систем и обсудим возможности их использования.

2.5.1. МОНОСЛОИ НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ФАЗ ВОЗДУХ—ВОДА

Многие молекулы с четко выраженными неполярными свойствами адсорбируются на границе раздела фаз воздух—вода [53], образуя слой толщиной всего в одну молекулу. Такой слой можно исследовать либо непосредственно на границе раздела, либо после его переноса на какую-либо подложку. Фосфолипиды и другие амфифильные молекулы образуют ориентированные монослои, в которых полярные группы контактируют с водной фазой, а углеводородные цепи обращены в воздух. Фосфолипиды образуют нерастворимые монослои, поскольку концентрация липида в водной фазе пренебрежимо мала. Такие монослои традиционно изучают с помощью пленочных весов Лэнгмюра (кюветы Лэнгмюра). С одной стороны кюветы имеет подвижный поплавок, позволяющий измерять площадь поверхности, на которой могут образовываться монослои (рис. 2.23). Для формирования нерастворимого монослоя известное количество липида (обычно находящегося в летучем растворителе) наносят на водную поверхность. Весы Лэнгмюра позволяют точно измерить площадь поверхности (A) и поверхностное давление (π) монослоя. Важным достоинством метода является возможность изменять эти параметры, поэтому он оказался особенно

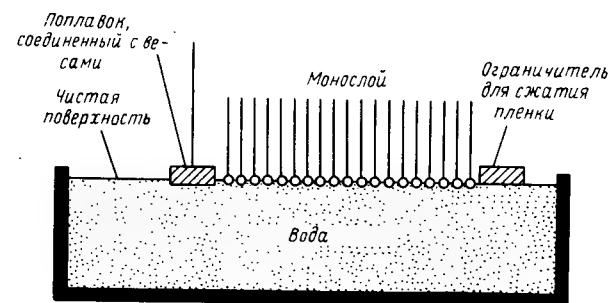


Рис. 2.23. Схематическое представление монослоя, образующегося в ванне Лэнгмюра [482]. Полярные головки погружены в воду, а неполярные цепи обращены в воздух.

полезным для изучения «поверхностно-активных» липидов, а также таких ферментов, как липазы [324], которые функционируют на границе раздела липид—вода. В монослой можно включать белки, однако в большинстве случаев эта система малоприспособлена для изучения поведения интегральных мембранных белков. Для характеристики монослоев обычно используют диаграммы «давление—площадь». Примеры таких диаграмм приведены на рис. 2.24. Они обладают двумя важными особенностями.

1. *Изломы*, которые отвечают кажущимся фазовым переходам из разреженной «жидкоподобной» или «газоподобной» фазы с низкой плотностью упаковки в более сжатое «твердоподобное» состояние с высокой плотностью упаковки. Фазовое поведение монослоев в каком-то смысле аналогично фазовым переходам бислоев [896, 1160, 505].

2. *Точка коллапса*, в которой молекулы упакованы в монослой с максимальной плотностью. Дальнейшее сжатие монослоя приводит к его разрушению. По точке коллапса можно определить минимальную площадь поверхности, приходящейся на молекулу.

Насыщенная алкильная цепь занимает площадь около 20 Å², что совпадает с данными рентгеноструктурного анализа. Цепи, содер-

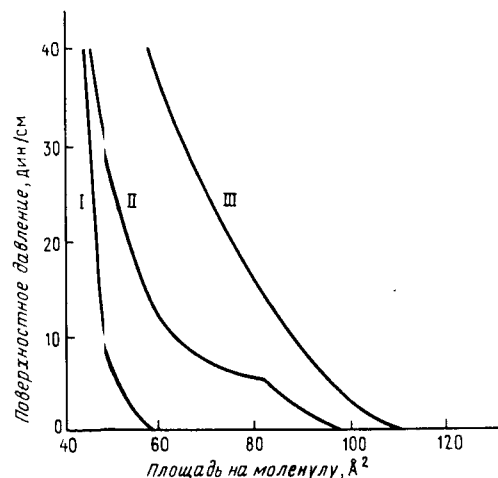


Рис. 2.24. Типичные диаграммы «давление—площадь» для фосфолипидных монослоев [698]. I — дигеиноилфосфатидилхолин (22:0) в «твердоподобной» фазе; II — дипальмитоилфосфатидилхолин (16:0), претерпевающий при сжатии фазовый переход из «жидкоподобного» в «твердоподобное» состояние; III — яичный фосфатидилхолин в «жидкоподобной» фазе.

жащие *цис*-двойные связи, из-за меньшей плотности упаковки занимают большую площадь. Минимальную площадь поверхности, необходимую для фосфолипидов с двумя насыщенными цепями, можно оценить величиной 40—45 Å², что отвечает гелевой фазе бислоя. Минимальная площадь, занимаемая липидной молекулой с одной *цис*-двойной связью в цепи, по-видимому, близка к 60 Å². Если липидная молекула имеет объемную полярную головку, как у фосфатидилхолинов или ганглиозидов, то минимальная площадь поверхности, приходящейся на молекулу, возрастает.

Фазовый переход между жидкой разреженной фазой и жидкой конденсированной изучался во многих теоретических и экспериментальных исследованиях (см., например, [1160, 53]). При определенном давлении в монослой индуцируется температурный фазовый переход, который можно сопоставить с переходом, наблюдаемым в бислое. Например, при давлении в 15 дин/см монослой дипальмитоилфосфатидилхолина претерпевает фазовый переход с $T_m = 27^\circ\text{C}$ и $\Delta H^0 = 8,7$ ккал/моль. Это довольно близко к параметрам соответствующего перехода в бислое с $T_m = 41^\circ\text{C}$ и $\Delta H = 8,7$ ккал/моль. Пинк [1160, 505] показал, что различие в T_m для монослоя и бислоя можно объяснить в рамках довольно простой модели, учитывающей очень слабое притяжение между двумя монослоями, составляющими бислой. Это весьма важный момент, поскольку отсюда следует, что с термодинамической точки зрения бислой ведет себя в значительной мере как два почти независимых монослоя. Поэтому можно ожидать, что если два монослоя, образующие мембрану, имеют разный состав, то их физические свойства будут в определенной степени независимыми друг от друга. Конечно, это положение может измениться под действием трансмембранных белков или каких-либо других компонентов мембран. Подробно об этом пойдет речь в гл. 4. Обсуждаемая нами модель отвечает внутреннему давлению бислоя $2 \cdot 15$ дин/см = 30 дин/см. Внутреннее давление возникает потому, что силы, стабилизирующие бислой, должны компенсировать стерическое отталкивание как углеводородных цепей, так и полярных головок. Обычно величина этого давления, по оценкам [1160], лежит в интервале 12,5 — 50 дин/см, что формально соответствует величине поверхностного натяжения [683].

Следует отметить, что давление π , измеренное для монослоя, на самом деле представляет собой разность между поверхностным натяжением на поверхности с нанесенным монослоем (γ) и поверхностным натяжением на границе раздела воздух—вода без монослоя (γ_0):

$$\pi = (\gamma_0 - \gamma).$$

Самопроизвольное формирование монослоя на границе раздела воздух—вода, естественно, приводит к уменьшению поверхностного

натяжения. Его можно рассматривать как отрицательное давление, возникающее благодаря взаимному притяжению молекул на границе раздела фаз, которое уменьшается под действием «поверхностно-активных» веществ, образующих монослой. Так, дипальмитоилфосфатидилхолин, являющийся основным компонентом легочного сурфактанта, уменьшает почти до нуля ($\gamma = 0$) работу, затрачиваемую на изменение площади поверхности легкого при дыхании [598].

Очень сильное впечатление производят картины, наблюдаемые с помощью метода так называемой эпифлуоресценции, когда в микроскоп следят за флуоресценцией липидной метки, включенной в монослой [946, 1145]. Используемые метки встраиваются предпочтительно либо в гелевую, либо в жидкокристаллическую фазу. Когда обе фазы присутствуют одновременно, на рассматриваемой поверхности наблюдаются светлые и темные пятна. Это связано с разной интенсивностью флуоресценции метки в разных фазах. Яр-

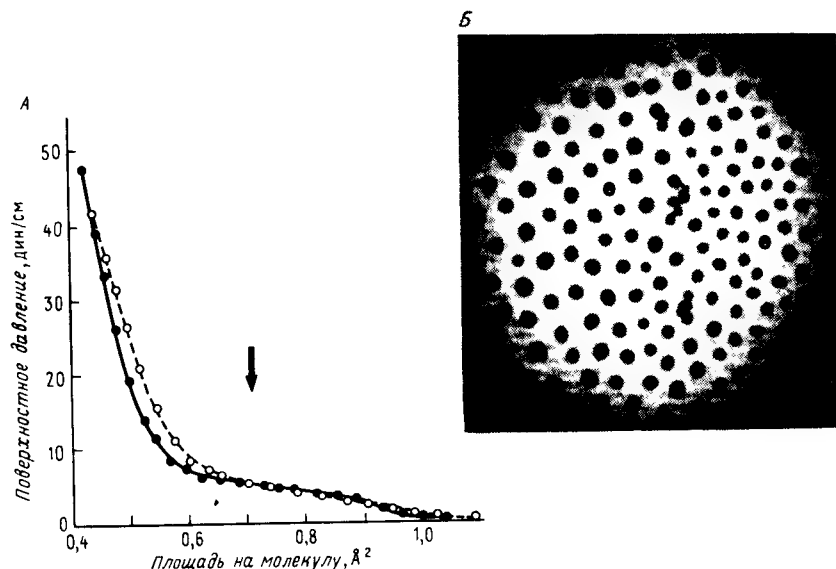


Рис. 2.25. А. Кривые «давление—площадь» для монослоя дипальмитоилфосфатидилхолина на поверхности дистиллированной воды при 20 °С. Образец содержит 2 мол.% флуоресцирующего фосфолипида NBD-фосфатидилэтаноламина (см. табл. 5.1). В точке, помеченной стрелкой, была сделана фотография флуоресцирующего монослоя (Б). Темные пятна — «твердоподобные» домены, а сильно флуоресцирующие области — «жидкоподобные» домены, в которых накапливается флуоресцентная метка. Регулярность в расположении доменов, по-видимому, определяется электростатическими силами. Размер поля зрения равен примерно 200 мкм (в диаметре). Из работы [946]. Фотография любезно предоставлена д-ром Н. McConnell.

кая, постоянно меняющаяся картина, связанная с появлением твердой фазы, возникает в монослоях дипальмитоилфосфатидилхолина уже при давлении порядка 5 дин/см (20° С), и по мере увеличения давления размер областей твердой фазы растет, а жидкой уменьшается. В образце, представленном на рис. 2.25, на молекулу в монослое приходится в среднем около 60 Å². Эти исследования не только подтверждают сосуществование разных фаз, но и свидетельствуют о наличии в монослое дальней упорядоченности, которая стабилизируется, по-видимому, за счет электростатических взаимодействий [946].

2.5.2. МОНОСЛОИ НА ТВЕРДОЙ ПОДЛОЖКЕ

Монослои, образовавшиеся на границе раздела воздух—вода, можно перенести на твердую подложку, например на алкилированное предметное стекло. Для этого достаточно просто прикоснуться этим стеклом к монослою [946]. За счет алкилирования поверхность стекла становится гидрофобной. Полярные головки липида после перенесения монослоя на такое стекло по-прежнему контактируют с водой. Таким образом можно исследовать монослои, перенесенные на твердую подложку при разных значениях поверхностного давления π . В работах [946, 1145, 1565, 1450] было показано, что динамические свойства и термодинамические характеристики монослоев на подложке, как и монослоев на границе раздела воздух—вода, близки к таковым для бислоев. Разработаны также флуоресцентные методы изучения ориентации молекул в монослое, находящемся на подложке [1450].

2.5.3. ПЛОСКИЕ БИСЛОЙНЫЕ МЕМБРАНЫ

Плоские мембраны обычно формируют путем нанесения акварельной кисточкой концентрированного раствора фосфолипида в таких растворителях, как декан, на перегородку из гидрофобного материала (например, из полистирола), в которой имеется небольшое отверстие (диаметром ~1 мм). Перегородка разделяет две камеры, содержащие водные буферные растворы. Большая часть растворителя переходит в воду, а липиды при соответствующих условиях сопроизвольно образуют бислойную пленку, затягивающую это небольшое отверстие. Такие мембраны часто называют бимолекулярными липидными мембранами (БЛМ), а поскольку они не отражают свет, то еще и черными липидными мембранами. Плоские

мембраны, полученные таким способом, можно использовать для изучения мембранных белков (например, ионных каналов [987, 988]), но их недостаток состоит в том, что они содержат следовые количества растворителя. Кроме того, они весьма нестабильны, особенно в присутствии небольших количеств детергентов и других примесей. Чтобы устранить проблемы, связанные с наличием следов растворителя, и облегчить включение в мембраны интегральных мембранных белков, была разработана другая методика приготовления плоских мембран [1009, 1010, 1011, 246]. В этом случае плоская мембрана формируется из монослоя на границе раздела фаз либо на кончике небольшой пипетки при ее простом погружении в раствор (рис. 2.26), либо на небольшом отверстии в перегородке из гидрофобного материала. Монослой, содержащие очищенные мембранные белки, можно получить на поверхности везикулярных белково-фосфолипидных дисперсий и использовать их для формирования плоских мембран. Кроме того, можно провести слияние мембранных везикул, содержащих ионные каналы, с предварительно сформированной плоской мембраной и таким путем включить в нее изучаемый белок (см. разд. 8.1.4).

Важным преимуществом плоских мембран является возможность проведения на них электрических измерений. Эта система особенно полезна для изучения пор, каналов или переносчиков, которые облегчают или ускоряют перенос заряда через бислой из одного водного компартмента в другой (гл. 8). В водные камеры трудно поместить электроды, растворы в них можно легко заме-

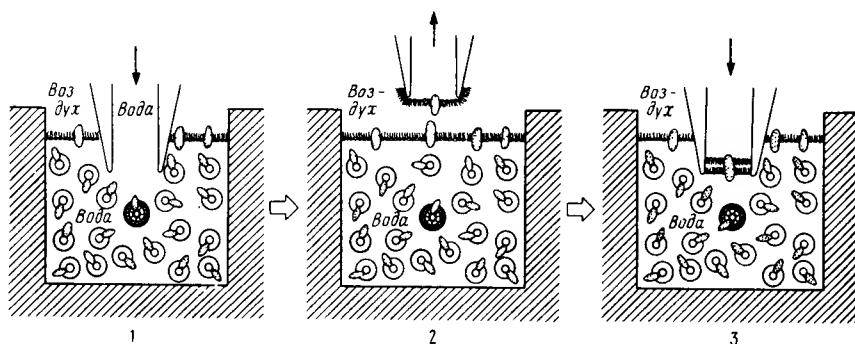


Рис. 2.26. Процесс формирования бислоя на кончике пипетки [1402]. На поверхности воды из реконструированных фосфолипидных везикул, содержащих изучаемый белок, образуется монослой (гл. 3). Пипетку погружают в раствор под положительным давлением (этап 1), и при последующем ее вынимании (этап 2) монослой прикрепляется к пипетке своими полярными головками, при этом углеводородные хвосты оказываются обращенными в воздух. Затем пипетку снова погружают в раствор (этап 3), и на ее кончике формируется бислой.

нять, а измерения тока и/или напряжения являются очень точными и отличаются высокой чувствительностью. Другая методика состоит в формировании мембран на кончике микропипетки (диаметром <1 мкм) (рис. 2.26). Небольшой фрагмент бислоя на такой «пэтч-пипетке» можно использовать для проведения очень чувствительных электрических измерений с реконструированными очищенными мембранными белками (например, с ацетилхолиновым рецептором) и исследовать различные процессы на молекулярном уровне [1402] (см. разд. 8.1.4).

2.5.4. ПЛОСКИЕ БИСЛОЙНЫЕ МЕМБРАНЫ НА ТВЕРДОЙ ПОДЛОЖКЕ

Фосфолипидные бислои можно также формировать на твердых гидрофильных подложках (например, на окисленных силиконовых пластинках), последовательно перенося два монослоя с границы раздела воздух—вода [1430]. Между твердой подложкой и липидными полярными головками, по-видимому, имеется водная прослойка. Таким способом можно получить стабильный бислой из монослоя с определенной средней площадью на молекулу. Эти бислои удобны для физико-химических исследований индивидуальных липидов, и, возможно, со временем они найдут применение и для изучения мембранных белков. В бислоях дипальмитоилфосфатидилхолина, приготовленных таким способом, происходит четкий температурных фазовый переход, как и в случае ламеллярных липидных дисперсий. Особенно ценны эти бислои для измерения латеральной диффузии мембраносвязанных молекул с помощью флуоресценции (см. гл. 5). Соответствующие результаты вполне согласуются с данными, полученными на других системах.

2.5.5. ЛИПОСОМЫ

Термин «липосомы» относится к любым липидным бислойным структурам, имеющим водное содержимое [312, 1417, 649]. Многие фосфолипиды при диспергировании в воде самопроизвольно образуют гетерогенную смесь везикулярных структур, состоящих из нескольких бислойных concentрических оболочек. Это были первые «липосомы», которые удалось охарактеризовать, и сейчас они называются мультиламеллярными везикулами (МЛВ). Большой интерес представляют моноламеллярные везикулы, т. е. везикулы, образованные одинарным бислоем. Их можно подразделить на малые

мономеллярные везикулы (ММВ) с диаметром от 200 до 500 Å и большие мономеллярные везикулы (БМВ) с диаметром от 500 до 5000 Å. Можно также приготовить гигантские фосфолипидные везикулы размером с клетку, имеющие диаметр до 300 мкм [1031].

Липосомы используют прежде всего как модельные системы, в которые можно встраивать различные белки, а также для создания систем доставки включенных в них лекарственных препаратов. Важными характеристиками липосом являются их липидный состав, средний диаметр и степень гетерогенности по размерам. О распределении липосом по размеру можно судить по данным 1) гельпроникающей хроматографии; 2) светорассеяния; 3) ультрацентрифугирования; 4) электронной микроскопии [1306, 1214]. Особый интерес для тех, кто исследует способность липосом включать в себя различные вещества, представляют такие параметры, как 1) *внутренний водный объем*, т. е. количество водорастворимого вещества в расчете на моль липида; 2) *эффективность включения*, или доля водного объема, включенного внутрь везикул. Первый параметр увеличивается с ростом диаметра липосом, а второй прямо пропорционален концентрации липида.

Рассмотрим некоторые методы получения липосом и их характеристики [312, 1417, 649].

1. *Малые мономеллярные везикулы (ММВ)*. Их обычно готовят путем ультразвуковой обработки водных дисперсий фосфолипидов [659]. Затем везикулы фракционируют по размеру методом гельпроникающей хроматографии или центрифугированием в градиенте глицерола [529], с тем чтобы получить очень гомогенную популяцию везикул диаметром ~250 Å. Другой способ приготовления таких везикул состоит в быстром введении этанольного раствора липида в водную фазу. Для приготовления ММВ можно использовать также пресс Френча.

Преимуществом таких везикул является их гомогенность, однако малый размер может быть и недостатком, по крайней мере следует иметь в виду, что при малом радиусе кривизны бислоя ММВ затрудняется упаковка в нем липидных молекул. Площадь поверхности наружного монослоя этих везикул почти вдвое больше площади внутреннего монослоя, поэтому около 70% липидов ММВ находится на наружной поверхности. Липидные молекулы, имеющие форму «обратного конуса» (см. рис. 2.18), например фосфатидилхолин или сфингомиелин, будут находиться преимущественно в наружном монослое, что приведет к липидной асимметрии бислоя. Эти упаковочные эффекты, вероятно, и определяют асимметричную ориентацию некоторых мембранных белков, встроенных в везикулы (ММВ и БМВ). Температурный фазовый переход липидов в ММВ уширен [841] — скорее всего в результате влияния малого радиуса кривизны на кооперативность перехода. Внутренний водный

Таблица 2.2. Параметры ММВ, приготовленных из яичного фосфатидилхолина [660]

Параметр	Значение
Молекулярная масса (гидродинамич.)	$1,88 \cdot 10^6$
Парциальный удельный объем	0,9848 мл/г
Радиус наружного монослоя	99 Å
Радиус внутреннего монослоя	62 Å
Толщина наружного монослоя	21 Å
Толщина внутреннего монослоя	16 Å
Число липидных молекул	
в наружном монослое	1 658
во внутреннем монослое	790
Площадь поверхности на полярную головку	
в наружном монослое	74 Å^2
во внутреннем монослое	61 Å^2
Поперечное сечение ацильных цепей в центре бислоя	
в наружном монослое	46 Å^2
во внутреннем монослое	97 Å^2
Толщина гидрофобной области бислоя	37 Å

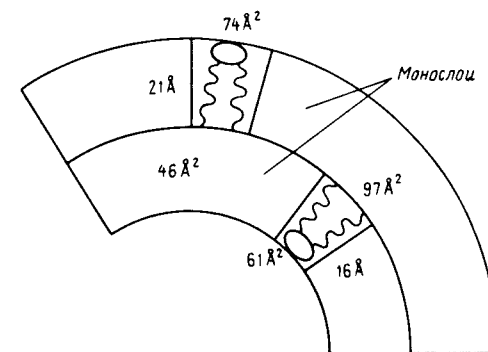


Рис. 2.27. Поперечное сечение бислоя в малых мономеллярных везикулах с указанием ряда характерных размеров [660].

объем ММВ довольно мал и лежит в пределах от 0,5 до 1 л/моль [312]. Некоторые характеристики ММВ приведены в табл. 2.2 и на рис. 2.27.

2. *Большие моноламеллярные везикулы (БМВ)*. Впервые большие везикулы были получены в 70-е годы, и с тех пор разработаны многочисленные методы их приготовления. Выбор метода зависит от липидного состава везикул и их предполагаемого назначения. Например, методы, при которых происходит разбавление липосомной дисперсии, оказываются непригодными для инкапсуляции лекарственных препаратов, а методы, основанные на использовании органических растворителей, не подходят для реконструкции белков. Чаще всего для получения БМВ используют следующие способы [312, 1417, 649].

а. *Диализ или разбавление детергентных растворов* [390, 993, 1475, 25]. Это наиболее популярный метод, использующийся для биохимических исследований, поскольку он пригоден для включения белков в образующиеся БМВ. Избытком детергента диспергируют липид (или липид с белком), а затем детергент удаляют. Детергенты, имеющие высокую ККМ, т. е. высокую равновесную концентрацию мономера, порядка мМ (например, холат, дезоксихолат, октилглюкозид), почти полностью удаляются диализом. Детергенты с низкой ККМ (например, тритон X-100) удаляются лишь частично; для этого используют гидрофобные смолы типа биобидс, которые избирательно связывают детергент (см., например, [1475]). В некоторых случаях достаточно просто разбавить смесь, чтобы снизить концентрацию детергента до уровня, при котором липиды начинают самопроизвольно формировать везикулы. Размер липосом зависит не только от типа используемого детергента или липида, но и от скорости удаления детергента [1475]. Обычно с помощью холата получают БМВ относительно небольшого размера (диаметром 500 — 800 Å), а с помощью октилглюкозида — популяцию более крупных везикул (1000 — 2000 Å). Определенные проблемы могут создавать следовые количества детергента [1120]. Внутренний объем БМВ намного больше, чем у ММВ, и обычно лежит в интервале от 5 до 20 л/моль [312].

б. *Инфузия и обращенно-фазовое упаривание* — это два разных метода, связанные с использованием неполярных растворителей для получения БМВ (см. [312, 1417]). Для приготовления модельных мембран, содержащих белки, эти методы мало пригодны.

в. *Методы слияния*. Здесь имеется несколько подходов, основанных на слиянии ММВ до образования липосом большого размера. К ним относятся повторные операции замораживания—оттаивания [898], которые пригодны для реконструкции некото-

рых мембранных белков, а также использование Ca^{2+} для слияния ММВ, содержащих фосфатидилсерин [1119].

г. *Добавление фосфатидилхолинов с короткими цепями* [479, 478] в количестве до 20% от общего содержания липидов. Было показано, что при этом мультиламеллярные бислои превращаются в стабильные БМВ.

д. *Добавление жирных кислот или детергентов* при определенных условиях вызывает слияние ММВ с образованием БМВ [724, 1310]. Добавление жирных кислот способствует также включению белков в бислой БМВ [1310].

е. *Быстрая экструзия* мультиламеллярной дисперсии через поликарбонатные фильтры дает БМВ диаметром 600 — 1000 Å [648, 649]. Этот метод имеет ряд существенных преимуществ.

ж. *Кратковременное повышение pH* приводит к образованию везикул из молекул фосфатидной кислоты, причем смеси, содержащие этот фосфолипид, образуют как ММВ, так и БМВ [606].

3. *Моноламеллярные везикулы клеточных размеров*. Эти структуры образуются при обычной гидратации липидов и липидно-белковых смесей в растворах с низкой ионной силой [1031]. Размер везикул составляет от 0,1 до 300 мкм, а их внутренний водный объем достигает 300 л/моль. Эти везикулы остаются стабильными при центрифугировании, проводимом для разделения их по размерам. Кроме того, в них можно вводить микроэлектроды для проведения электрических измерений.

4. *Мультиламеллярные везикулы*. Как правило, они не используются, поскольку по ряду своих характеристик значительно уступают моноламеллярным везикулам. Эти везикулы осмотически активны [1621], но сложность их внутренней организации затрудняет анализ результатов измерения осмотической активности.

2.6. Резюме

Физико-химические исследования липидных бислоев имеют важное значение для понимания свойств биологических мембран. Поведение индивидуальных липидов как таковых или в смеси с другими липидами можно анализировать — по крайней мере на качественном уровне, — основываясь на геометрической форме молекул. Это позволяет обобщить информацию о характере взаимодействия липидных молекул. Такой подход, по-видимому, оправдан и в случае сложно организованных биологических мембран, поэтому изучение индивидуальных липидов и их смесей имеет непосредственное отношение к биологическим системам. Для липидных систем характерен

полиморфизм; в них могут существовать разные фазы в зависимости от температуры, давления, ионной силы и липидного состава. Липидный бислой в биологических мембранах наиболее близок по своим свойствам к ламеллярной жидкокристаллической фазе, которая достаточно хорошо изучена в случае индивидуальных липидов и их смесей.

Липидный бислой стабилизируется силами гидрофобного взаимодействия, способствующими образованию таких структур, в которых площадь контакта между водой и неполярными углеводородными цепями минимальна. Важную роль играют также межмолекулярные взаимодействия в области полярных головок, в частности гидратация и водородные связи. Полезную информацию о структуре и динамике бислоя дают спектральные методы, например ЯМР и спектроскопия КР.

Значительный вклад в изучение мембран вносят исследования модельных систем — монослоев, плоских бислоев и липосом. Каждая из этих систем имеет свои преимущества и недостатки, но в целом все они сыграли большую роль в углублении наших знаний о биологических мембранах.

Глава 3

МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ: ХАРАКТЕРИСТИКА И СТРУКТУРНЫЕ ПРИНЦИПЫ

3.1. Структура мембранных белков

Основная роль липидов в составе мембран заключается в стабилизации бислоевой структуры, а белки являются активными компонентами биомембран. В этой главе мы обсудим некоторые принципы, оказавшиеся полезными для выяснения структурных особенностей мембранных белков. Мы приведем примеры, иллюстрирующие эти принципы, а основные функциональные классы мембранных белков рассмотрим в гл. 6, 8, 9. Взаимодействия между мембранными липидами и белками суммированы в гл. 5; там же обсуждается подвижность липидных и белковых компонентов.

На заре развития мембранологии полагали, что мембранные белки по своей структуре довольно гомогенны и уложены в виде β -слоев по поверхности бислоя. Сейчас скорее склонны считать, что по крайней мере у трансмембранных белков те их участки, которые погружены в мембрану, содержат α -спирали. Конечно, очень хотелось бы сделать какие-то однозначные выводы по этому поводу, но они должны основываться на фактических данных. Перед лицом огромного структурного разнообразия растворимых белков [1305] приходишь к заключению, что интегральные мембранные белки могут оказаться гораздо сложнее, чем мы сейчас представляем. Классификация растворимых белков по типам структур была проведена только после того, как установили с высоким разрешением структуру более 100 различных белков. Что касается трансмембранных белков, то это удалось сделать только в одном случае — для белка фотосинтетического реакционного центра бактерий (разд. 3.5.1). Вместе с электронно-микроскопическими данными низкого разрешения о структуре бактериородопсина (разд. 3.5.2) это единственный источник, на котором может основываться построение моделей для большинства других трансмембранных белков.

Еще один важный момент — способы прикрепления белков к мембране. Они схематически представлены на рис. 3.1.

1. *Связывание с белками, погруженными в бислой.* В качестве примеров можно привести F_1 -часть H^+ -АТФазы, которая связывает-

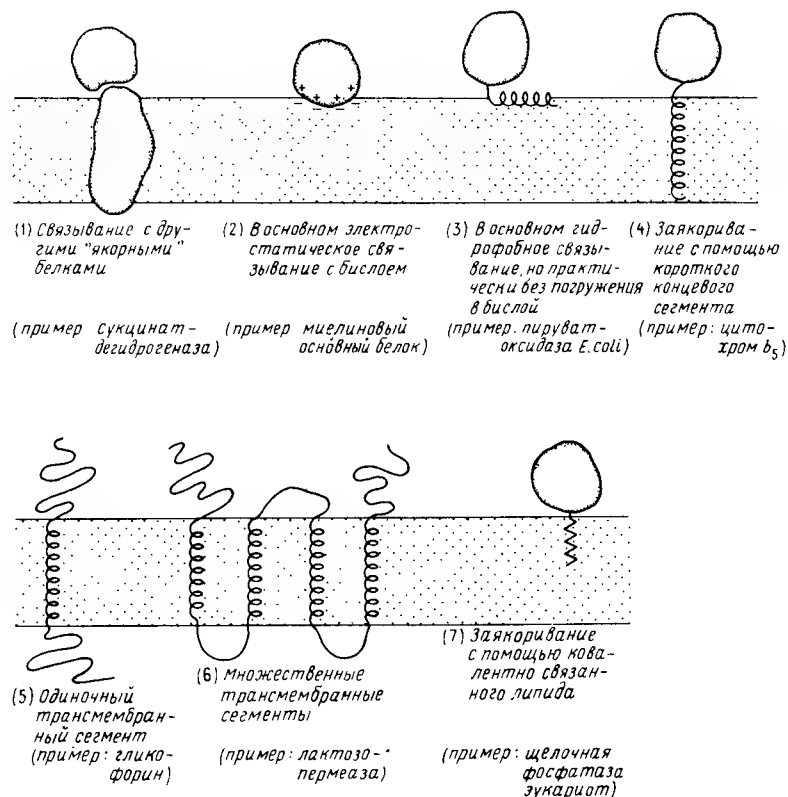


Рис. 3.1. Различные способы прикрепления мембранных белков к мембране. Пептидный якорь (4) может находиться либо на N-, либо на C-конце молекулы. N- и C-концы трансмембранных белков (5 и 6) могут находиться как у наружной, так и у внутренней поверхности мембраны (см. рис. 10.3).

ся с F_0 -частью, погруженной в мембрану (см. разд. 8.4.2); можно упомянуть также некоторые белки цитоскелета (разд. 4.3.4).

2. Связывание с поверхностью бислоя. Это взаимодействие имеет в первую очередь электростатическую природу (например, основной белок миелина [201]) или гидрофобную (например, поверхностно-активные пептиды [385] и, возможно, фосфолипазы [324]). На поверхности некоторых мембранных белков имеются гидрофобные домены, образующиеся благодаря особенностям вторичной или третичной структуры. Указанные поверхностные взаимодействия могут использоваться как дополнение к другим взаимодействиям, например к трансмембранному заякориванию.

3. Связывание с помощью гидрофобного «якоря»; эта структура обычно выявляется как последовательность неполярных аминокислотных остатков (например, у цитохрома b_5 [1420]; см. разд. 4.2.2). Некоторые мембранные белки используют в качестве якоря ковалентно связанные с ними жирные кислоты или фосфолипиды (разд. 3.8).

4. Трансмембранные белки. Одни из них пересекают мембрану только один раз (например, гликофорин [1323], рис. 3.17), другие — несколько раз (например, лактозопермеаза [453], рис. 8.11; бактериородопсин [620], рис. 3.8).

Различиями между наружными (или периферическими) и внутренними (или интегральными) мембранными белками не задается однозначно способ их прикрепления к бислою; эти различия определяют лишь относительную силу их связывания.

3.2. Очистка мембранных белков

Для очистки интегральных мембранных белков и получения их в биохимически активной форме необходимы детергенты, позволяющие солиubilизировать белки и сохранить их в растворе. Соответствующие требования к детергентам и правилам обращения с ними создают дополнительные проблемы помимо тех, с которыми обычно сталкиваются при очистке белков. Для выделения интегральных мембранных белков разработано много специальных методов (см., например, работы [905, 1184, 1308]), однако большинство схем очистки основано на тех же хроматографических и гидродинамических методиках, которые используются для растворимых белков. Это хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе, сефарозе или гидроксилапатите, гель-фильтрация, центрифугирование в градиенте плотности сахарозы и т. д. Очень важен правильный выбор детергента, поскольку именно детергент разрушает биомембрану, занимая место липидов, окружающих тот или иной белок, и определяет стабильность белка в растворе. Механизмы действия детергентов рассмотрены в обзоре [614].

3.2.1. ДЕТЕРГЕНТЫ

В течение последних двух десятилетий появилось очень много детергентов, пригодных для очистки интегральных мембранных белков. В принципе нужно пытаться найти такой детергент, который не нарушал бы вторичную и третичную структуры мембранных белков, а лишь замещал бы большинство или все мембранные липиды, контактирующие с гидрофобными участками белковой молекулы. Конечной целью солиubilизации является встраивание белка в детер-

гентиую мицеллу; последующая стратегия очистки состоит в разделении таких белково-детергентных комплексов.

Первая проблема — это подбор оптимальных условий солюбилизации изучаемого белка. Детергенты, денатурирующие белки (например, ДСН), не подходят для решения такой деликатной задачи. С другой стороны, многие детергенты недостаточно эффективно разрушают мембраны и образуют белоксодержащие смешанные мицеллы. Такие детергенты могут быть либо слишком гидрофобными, либо слишком гидрофильными для эффективного смешивания с мембранными липидами и — при достаточно высокой их концентрации — для превращения бислоя в глобулярные смешанные мицеллы. Сначала надеялись, что выбор необходимого детергента удастся систематизировать с помощью одного параметра, называемого гидрофильно-липофильным балансом (ГЛБ). Этот параметр, изменяющийся от 1 до 20, используется при получении сурфактантов [293] в качестве меры относительной гидрофобности. Действительно, получены некие корреляции, из которых следует, что значение ГЛБ детергента может использоваться для предсказания его поведения в биологических системах (см., например, [1478]). Вообще говоря, можно сказать, что детергенты со значением ГЛБ в диапазоне от 12,5 до 14,5 являются наиболее эффективными растворителями интегральных мембранных белков. Однако впоследствии выяснилось, что поиск оптимальных детергентов для определенного мембранного белка требует учета многих факторов и всегда должен сопровождаться эмпирической проверкой. Необходимо учитывать следующее.

1. *Максимальная солюбилизация исследуемого белка.* Критерием является переход белка в супернатант после центрифугирования, при котором происходит осаждение мембраны (например, после центрифугирования при 100 000 g в течение 1 ч).

2. *Солюбилизация белка в нужной форме.* Обычно речь идет о сохранении его ферментативной активности, но иногда используются определенные спектральные характеристики или наличие конкретных белковых ассоциатов [1221]. Кроме того, необходимым условием является стабильность белка после солюбилизации. В некоторых случаях для поддержания биохимической активности вместе с детергентом добавляют экзогенные фосфолипиды. В качестве примера можно привести получение лактозопермеазы *E. coli* [1062] и белка натриевого канала [70]. Иногда для стабилизации белка после солюбилизации добавляют глицерол или другой полиол (этот подход используется в случае растворимых белков). Имеет смысл использовать также ингибиторы протеаз и проводить солюбилизацию в условиях, сводящих к минимуму вероятность их протеолитического расщепления.

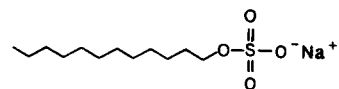
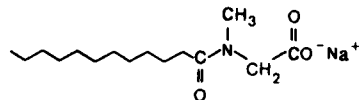
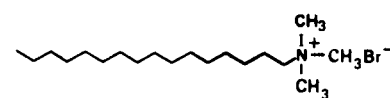
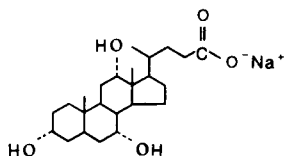
3. *Возможность использования детергента в данной методике.* Необходимо прежде всего учитывать заряд детергента (ионообмен-

ная хроматография), поведение при данном значении pH (так, соли желчных кислот часто выпадают в осадок при pH < 8), ККМ и размер мицелл детергента. Последние свойства особенно важны. Детергенты с низкой ККМ, образующие крупные мицеллы, не удаляются при диализе или ультрафильтрации из-за слишком низкой концентрации мономеров детергента (а именно они достаточно малы для прохождения через поры мембран). С практической точки зрения это означает, что если концентрировать белок с помощью ультрафильтрации, то будет возрастать и концентрация детергента с низкой ККМ, а это может привести к денатурации белка. По этой причине многие исследователи предпочитают использовать детергенты с высокими ККМ, например октилглюкозид, соли желчных кислот или более современные цвиттерионные детергенты. Весьма ценными являются полистиреновые смолы, такие, как биобидз SM-2 [473]. Они избирательно связываются с детергентами типа тритон X-100, удаляют их из раствора и позволяют обойтись вообще без диализа. Еще один фактор, который необходимо учитывать, — это поглощение света детергентом. Некоторые детергенты, например тритон X-100, поглощают в ближней УФ-области, что делает невозможным определение концентрации белка по измерению оптической плотности при длине волны 280 нм.

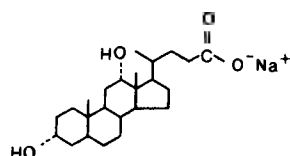
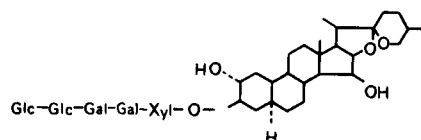
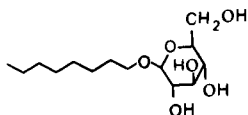
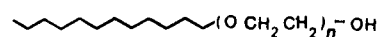
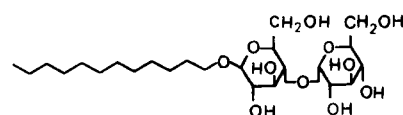
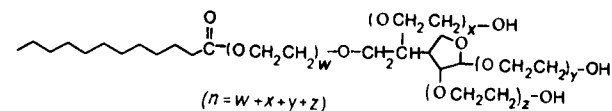
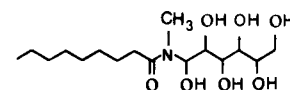
С учетом всех этих факторов становится понятно, почему во многих случаях при выделении интегральных мембранных белков приходится использовать разные детергенты. Например, для солюбилизации можно применять тритон X-100, а разделение с помощью ДЭАЭ-целлюлозы лучше проводить в присутствии октилглюкозида. Детергенты можно менять на стадии хроматографии, во время центрифугирования в градиенте плотности, а в некоторых случаях — с помощью диализа. Следует иметь в виду, что детергент, непригодный для солюбилизации определенного белка, может быть очень эффективным для сохранения белка в растворе после замены детергента [614]. Очистку почти всегда следует проводить при избытке детергента в растворе, в противном случае равновесие будет сдвинуто в сторону агрегации мембранных белков, а не в сторону образования белково-детергентных комплексов. В некоторых случаях подобная агрегация может быть даже желательна, и последняя стадия очистки может состоять в удалении детергента (например, при очистке гликофорина, цитохрома *b₅*, цитохром с-оксидазы). Но, как правило, при недостатке детергента происходят необратимое осаждение и потеря белка.

Необходимость поддержания концентрации детергента на определенном уровне (обычно вблизи ККМ или выше) создает дополнительные трудности помимо тех, с которыми обычно сталкиваются при очистке белков; о некоторых из них мы уже говорили (например, о трудности концентрирования белка посредством ультрафильтра-

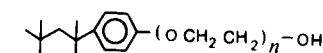
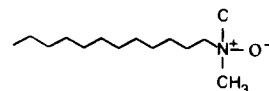
Таблица 3.1. Структурные формулы некоторых детергентов, используемых для солюбилизации и очистки мембранных белков

АнионныеДодецилсульфат натрия
(лаурилсульфат натрия)Додецил-N-саркозинат натрия
(лаурил-N-саркозинат натрия)
(Саркозил L)**Катионные**Цетилтриметиламмонийбромид
(Гексадецилтриметиламмонийбромид)
(ЦТАБ)**Соли желчных кислот**
Холат натрия

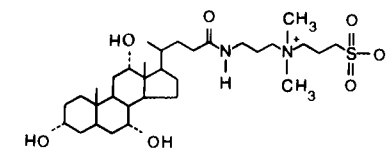
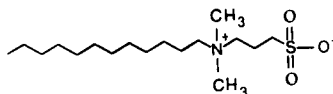
Дезоксихолат натрия

**Незаряженные**
Дигитонин β -D-ОктилглюкозидПолиоксизтиленовые спирты
(обозначаемые C_xE_n)
(1) Серию Бридж
(2) Луброл (WX, PX) β -D-Додецилмальтозид
(лаурилмальтозид)Эфиры жирных кислот
полиоксизтилен-
сорбитана
(обозначаемые C_x -
сорбитан- E_n)
серии ТвинАлкил-N-метилглюкамиды
(MEGA®)Полиоксизтилен-*para*-трет-октилфенолы
(обозначаемые *трет*- C_8 $\oplus$ E_n)

- (1) Тритон X-100, $n = 9,6$
(2) Тритон X-114, $n = 7-8$
(3) Нонидет P-40, $n = 9$

**Цвиттерионные**Лаурилдиметиламинооксид
(ЛДАО)
(Додециламин-N-оксид)

CHAPS®

Сульфобетаины
(Цвиттергернты)

* Торговая марка, CalBiochem

ции). Проблемы возникают и при использовании стандартного метода высаливания при высокой концентрации сульфата аммония: во многих случаях белок осаждается в комплексе с детергентом и липидом. Поскольку солевой раствор имеет высокую плотность, а детергент в агрегате — относительно низкую, то при центрифугировании преципитат будет оставаться на поверхности (см. дополнение 1.2). Важно помнить, что очистке подвергаются белково-детергентные комплексы, нередко со значительным количеством связанного фосфолипиды. Это сказывается на качестве разделения при хроматографировании, а также на результатах характеристики конечного про-

Таблица 3.2. Свойства отдельных детергентов

Детергент	ККМ, мМ	Мол. масса	Размер мицеллы	Агрегационное число	Удельный объем, мл/г	Ссылки
Додecilсульфат натрия	1,33	288	24 500	85	0,864	[612, 1383]
Холат натрия ¹⁾	3	408	2100	5	0,778	[612, 1383]
Дезоксихолат натрия ¹⁾	0,91	392	23 000	55	0,771	[612, 1383]
C ₁₂ E ₈	0,11	538	68 000	12	0,973	[612, 1383, 1434]
Тритон X-100 ²⁾	0,24	628	90 000	140	0,908	[612, 1383]
Твин 80 ²⁾	0,012	1300	76 000	60	0,896	[612, 655]
Лаурилдиметил-аминоксид	2,2	229	17 000	75	1,112	[612]
β -D-Октил-глюкозид	25	293	8000	27	0,820	[1242, 1213 612]
β -D-Лаурил-мальтозид	0,16	510	50 000	98	0,820	[1242]
CHAPS	8	615	6150	10	0,802	[637]
Цвиттергент 3-12	3,6	335	—	—	0,957	[527, 1383]

¹⁾ Свойства растворов солей желчных кислот сильно зависят от температуры, pH, типа провонона и ионной силы. В зависимости от условий образуются малые или большие мицеллы. Данные приведены для следующих условий: 0,15M NaCl, 20 °C, pH 9. При pH на единицу выше pK_a соли желчных кислот осаждаются, что может привести к образованию гелей, особенно в присутствии дезоксихолата. Значение pK_a для холата равно 5,2, а для дезоксихолата — 6,2 [612].

²⁾ Эти детергенты являются полидисперсными смесями. В таблице приведены средние значения. Для разных образцов они, вероятно, различаются.

дукта (см. следующий раздел). В табл. 3.1 и 3.2 перечислены наиболее широко используемые детергенты и указаны их свойства, важные для обсуждаемых нами вопросов. Эмпирически наиболее эффективными являются: 1) неионные детергенты (тритон X-100, октилглюкозид); 2) соли желчных кислот (холат, дезоксихолат); 3) цвиттерионные детергенты (CHAPS, цвиттергент). Но выбор детергента, наиболее приемлемого для солубилизации и очистки определенного мембранного фермента, по-прежнему осуществляется методом проб и ошибок.

3.3. ХАРАКТЕРИСТИКА ОЧИЩЕННЫХ ИНТЕГРАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Характеристика очищенных мембранных белков, даже самых простых, может составлять определенные трудности. Как и в случае

растворимых белков, нужно определить число и молекулярную массу полипептидных субъединиц, их стехиометрию, размер и, возможно, форму молекулы, а также, если это необходимо, биохимическую активность.

3.3.1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА СУБЪЕДИНИЦ (ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПААГ)

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додecil-сульфата натрия — это обычная методика, но в случае интегральных мембранных белков при ее применении возникают особые проблемы. В этом методе додecilсульфат связывается с полипептидными цепями, и комплексы белок—ДНС разделяются в полиакриламидном геле в соответствии с их стоксовыми радиусами, которые в большинстве случаев зависят от молекулярной массы. Молекулярную массу определяют, сравнивая электрофоретическую подвижность данного комплекса с известным стандартом. Однако связывание ДНС с неизвестным белком может качественно отличаться от связывания со стандартами, и тогда будет получен неправильный результат. Подобная ситуация наблюдается для интегральных мембранных белков с высоким содержанием неполярных аминокислотных остатков. С большинством растворимых белков (за исключением гликопротеинов) ДНС образует комплексы в соотношении 1,4 г ДНС на 1 г белка [1211], а с белками, содержащими большой процент неполярных остатков, может связываться больше детергента. Возникающий при этом дополнительный отрицательный заряд приводит к аномальному повышению электрофоретической подвижности, и определяемая молекулярная масса оказывается меньше, чем на самом деле. Возможна и другая ситуация. Связывающийся с ДНС мембранный белок может находиться в не полностью развернутом состоянии, что тоже приведет к аномальному повышению электрофоретической подвижности из-за образования более компактного комплекса белок—ДНС. Все эти эффекты весьма существенны. Например, лактозопермеаза имеет кажущуюся мол. массу 33 000, если измерять ее с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии ДНС; в действительности же, как показывают результаты генетического анализа [159], ее мол. масса равна 46 000. Во многих случаях удается оценить молекулярную массу более точно, если построить график Фергюсона, представляющий собой зависимость электрофоретической подвижности от содержания акриламида как для стандартных белков, так и для исследуемого белка [611]. Этот график зависит от радиуса Стокса и в меньшей степени — от заряда комплекса (т. е. от количества связанного ДНС). Например, по результатам электрофореза в 12%-ном акриламидном геле одна из субъединиц цитохромного комплекса *E. coli* имеет кажущуюся мол. массу 28 000, а из графика

ка Фергюсона получается величина 43 000 [990], что совпадает с мол. массой, рассчитанной по данным о секвенировании соответствующей ДНК.

Еще одна проблема — возможное наличие четвертичной структуры. Некоторые мембранные белки агрегируют даже в присутствии ДСН. Например, гликофорин А [25, 3200] или белок оболочки бактериофага М13 (или fd) [1082] при электрофорезе в полиакриламидных гелях с ДСН находятся в основном в виде димеров. Иногда агрегация еще более усиливается при нагревании смеси белок—ДСН. Такая картина наблюдается, например, для субъединиц как митохондриальной, так и бактериальной терминальных оксидаз [990]. Чтобы оценить способность белка к необратимой агрегации, следует провести сравнительный анализ результатов электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН для прогретых и прогретых проб. Сходная проблема иногда возникает из-за присутствия детергента, использованного при очистке мембранного белка. Этот детергент необходимо удалить и заменить на ДСН, поскольку в некоторых случаях наблюдается четкая зависимость электрофоретической подвижности от присутствия детергента, с помощью которого солиubilизировали фермент.

Итак, есть основания думать, что оценка молекулярной массы субъединиц сильно неполярных интегральных мембранных белков, определенная с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН, может оказаться неверной. К несчастью, простая альтернатива этому методу отсутствует, и правильную величину часто получают либо по данным о полной первичной последовательности (обычно последовательности соответствующего гена), либо с помощью точного гидродинамического анализа.

3.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ НАТИВНОГО БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ ГИДРОДИНАМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Применение этих методов для мембранных белков может быть сопряжено с большими трудностями, вызванными связыванием детергента. Чтобы оценить это в полной мере, рассмотрим вначале простой *растворимый* белок, для которого установлена мол. масса субъединиц с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН и необходимо узнать, чем он является в неденатурированной, активной форме — мономером, димером или олигомером более высокого порядка. Для определения молекулярной массы белков часто используется гель-фильтрация, включающая сравнение со стандартными белками; здесь возникают проблемы, связанные с тем, что все стандартные белки имеют глобулярную форму, а исследуемый белок может быть не глобулярным, а слегка удлинненным. Такой белок с мол. массой 50 000 может элюировать со скоростью, соответствующей мол. мас-

се 100 000. В связи с этим колонка для гель-фильтрации должна быть прокалибрована в соответствии со значениями радиуса Стокса, т. е. с размерами «эквивалентной гидродинамической сферы», а кроме того, параллельно необходимо использовать какой-либо другой метод. Обычно измеряют скорость седиментации с помощью либо аналитического ультрацентрифугирования, либо центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Коэффициент седиментации равен

$$S^0 = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{N\delta\pi\eta R_c}, \quad (3.1)$$

где M — молекулярная масса белка,

$\bar{V}$ — его парциальный удельный объем (величина, обратная плотности),

η — вязкость раствора (~ 1 сантипуаз),

ρ — плотность раствора (~ 1 г/мл).

Поскольку ρ и η известны, а R_c можно определить с помощью гель-фильтрации, остаются только две неизвестные величины — $\bar{V}$ и M . Для водорастворимых белков $\bar{V}$ можно вычислить исходя из аминокислотного состава [231] или непосредственно измерить либо просто принять равным 0,72—0,75 мл/г. Таким образом, измерив S^0 , можно найти M .

Рассмотрим теперь ситуацию с мембранным белком. Здесь возникают дополнительные проблемы, поскольку гидродинамическая частица — это белково-детергентный комплекс, поэтому M и $\bar{V}$ в данном случае являются молекулярной массой и удельным объемом комплекса, M_k и $\bar{V}_k$. К сожалению, $\bar{V}_k$ нельзя оценить, не зная ничего о составе комплекса. В этом случае для нахождения молекулярной массы белка используют два метода.

1. Прямо измеряют количество связанного детергента на 1 г белка. Для этого используют спектральные методы или радиоактивно меченный детергент, а для выделения комплексов применяют различные методы, например гель-фильтрацию. Установив относительное содержание белка и детергента в комплексе, значение $\bar{V}_k$ получают как средневзвешенное соответствующих величин для чистого белка и чистого детергента. После этого без труда находят M_k , а поскольку соотношение между белком и детергентом в комплексе известно, находят молекулярную массу белка (см., например, [567, 1281]).

2. Измеряют S^0 в средах с разными значениями плотности раствора ρ . Такие среды обычно получают, используя смеси H_2O и D_2O . Из графика зависимости S^0 от ρ находят как M_k , так и $\bar{V}_k$. При этом предполагается, что $\bar{V}_k$ — это средневзвешенное соответствующих величин для чистого белка и чистого детергента.

$$\bar{V}_k = (\text{Доля белка}) \cdot \bar{V}_{\text{белок}} + (\text{Доля детергента}) \cdot \bar{V}_{\text{детергент}}. \quad (3.2)$$

Оценив $\bar{V}_{\text{белок}}$ и взяв $\bar{V}_{\text{детергент}}$ из таблиц (табл. 3.2), получают молекулярную массу белковой составляющей M_k .

Для построения графика зависимости S^0 от ρ проводят аналитическое центрифугирование (см. [567, 1401, 1281, 1213]). Можно проводить центрифугирование и в градиенте плотности сахарозы, используя смеси H_2O и D_2O , но анализ результатов в этом случае гораздо сложнее, хотя принципиально не отличается от предыдущего случая [1357].

Альтернативный способ определения молекулярной массы нативной формы мембранного белка состоит в равновесном ультрацентрифугировании. Распределение вещества в состоянии равновесия таково, что наклон графика зависимости логарифма концентрации от r^2 равен

$$\text{Наклон} = \frac{\omega^2 M(1 - \bar{V}\rho)}{2RT}, \quad (3.3)$$

где r — расстояние от центра ротора до данной точки в центрифужной пробирке, ω — частота вращения.

Если величина $\bar{V}$ известна или ее легко оценить, как для большинства растворимых белков, эта задача решается достаточно просто. Что касается мембранных белков, то в этом случае определяют на-

клон указанной прямой при разных значениях ρ , получаемых смешиванием H_2O и D_2O . Как и ранее, одновременно находят M_k и $\bar{V}_k$ и далее определяют молекулярную массу белка [567, 1401, 1281].

Если в комплексе присутствует третий компонент (например, какое-то количество связанного липида) [567], возникают дополнительные проблемы. В любом случае все описанные процедуры весьма сложны и могут давать ошибочные результаты. Количество детергента, связанного с очищенными интегральными мембранными белками, может быть весьма существенным — от 0,3 до 1,5 от массы белка, и даже небольшие ошибки в этой величине приведут к значительному искажению молекулярной массы белка. В табл. 3.3 приведены данные о количестве детергентов, присутствующих в некоторых белковых препаратах. Заметим, что растворимые белки с этими детергентами не связываются [613, 909, 223]; это опять свидетельствует о том, что за связывание с детергентом ответственна именно неполярная часть белка, обычно контактирующая с мембранными липидами.

3.3.3. МЕТОД РАДИАЦИОННОЙ ИНАКТИВАЦИИ [742, 1512]

Метод радиационной инактивации для определения размера мишени все чаще применяется при исследовании мембранных белков [741, 742, 1512, 524]. Изучать можно как очищенные белки, так и неочищенные препараты, в том числе интактные биомембраны. Суть метода состоит в определении доли белковых молекул, получающих повреждения при облучении. Для этого используют ферментативные методы связывания гормонов или других лигандов или спектральные методы. Процедура состоит в следующем. Образец, обычно замороженный, подвергают высокоэнергетическому облучению (например, облучают пучком электронов из синхротрона). Через разные промежутки времени отбирают пробы, размораживают их и проводят измерения. Повреждения белка под действием излучения (в частности, разрыв ковалентных связей) выявляют, например, с помощью электрофореза в ПААГ с ДСН. Как показывает опыт, некоторые субъединицы полностью утрачивают биологическую активность при внесении радиационного повреждения в любое место полипептидной цепи. Ключевым моментом является то, что, чем крупнее белковая молекула, тем больше вероятность ее повреждения и, следовательно, вероятность инактивации. Эта вероятность зависит не от формы молекулы, а от ее массы. Обычно для того, чтобы облегчить интерпретацию результатов, параллельно облучают белок с известной молекулярной массой. Если исследуемый белок содержит более одной субъединицы, возникают определенные трудности при анализе результатов [1512]. Повреждение одной субъединицы не обязательно сопровождается разрывом ковалентных связей в других субъедини-

Таблица 3.3. Связывание детергентов с некоторыми мембранными белками

Белок	Детергент	Количество связанного детергента, мг на 1 мг белка	Ссылки
Na ⁺ /K ⁺ -АТРаза	Тритон X-100	0,28	[558]
Ca ²⁺ -АТРаза	Тритон X-100	0,20	[558]
Белок полосы 3	Тритон X-100	0,77	[558]
Ацетилхолиновый рецептор	Тритон X-100	0,70	[558]
Родописин	Тритон X-100	1,10	[558]
Переносчик ADP/ATP	Тритон X-100	1,5	[567]
Инсулиновый рецептор	Тритон X-100	0,15; 0,31; 0,54	[1169, 7]
Инсулиновый рецептор	Дезоксихолат	0,01; 0,03	[7]
Цитохром с-оксидаза	Тритон X-100	0,6	[1281]
Цитохром с-оксидаза	Лаурилмальтозид	0,55	[1401]

цах. Поэтому для ферментов, состоящих из разных субъединиц, обладающих неодинаковыми активностями, могут быть получены разные размеры мишени в зависимости от метода определения степени инактивации.

Примечательной особенностью метода является то, что его можно использовать для изучения интегральных мембранных белков *in situ*. Возникающие при этом артефакты и проблемы рассмотрены в работе [741]. Одна из очевидных проблем — необходимость использования высокоэнергетического излучения. В связи с этим большинство работ приходится проводить в сотрудничестве с лабораториями, в которых имеются соответствующие источники и освоены специальные методы анализа.

3.3.4. СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ И ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА

Для определения содержания α -спиралей и β -слоев в мембранных белках используют несколько методов. В отсутствие трехмерной организации на их основе можно попытаться построить соответствующие модели. Чаще всего используется метод кругового дихроизма (КД). Все более широкое применение находят инфракрасная и рамановская спектроскопия, а также ЯМР.

1. *Метод кругового дихроизма* [183] основан на измерении разности поглощения лево- и правополяризованного света; эта *оптическая активность* является мерой хиральности молекул, или мерой их асимметрии. В дальней ультрафиолетовой области (от 190 до 240 нм) КД определяется в основном поглощением амидов карбонильных групп полипептидного остова. При наличии участков вторичной структуры, например α -спиралей, спектр КД имеет вполне определенные особенности, связанные с особенностями электронного окружения амидных групп в этих структурах. Анализируя спектр КД белков, его обычно представляют как сумму компонентов, отвечающих поглощению разных участков белковой молекулы: α -спиралей, β -слоев и случайных клубков. Определив тем или иным способом спектры каждой из этих структур, производят их суммирование, подбирая соответствующие коэффициенты таким образом, чтобы было достигнуто наилучшее соответствие измеренному спектру. Подобранные весовые коэффициенты представляют собой ту долю, которая приходится в молекуле на каждый из типов вторичной структуры.

Эти методы были разработаны для растворимых белков, но нет никаких оснований сомневаться, что их можно с успехом применять и для мембранных белков. Скорее всего у последних имеются участки с такими же типами вторичной структуры, как и у растворимых белков, и при их изучении возникнут такие же трудности. Некоторые белки можно изучать *in situ*, используя суспензии мембран. Примера-

ми такого рода являются бактериородопсин из пурпурной мембраны *Halobacterium halobium* и Ca^{2+} -АТФазы из мембраны саркоплазматического ретикулума. Очищенные мембранные белки можно исследовать с помощью КД и в присутствии детергентов, если поглощение последних в дальней УФ-области не слишком велико, или в составе реконструированных везикул. Здесь возникают две проблемы: 1) дифференциальное светорассеяние, когда размер мембранных частиц гораздо больше длины волны света; 2) выравнивание поглощения из-за концентрирования белка в мембранах или везикулах, т. е. из-за неомогенности его распределения в растворе. Эти артефакты могут быть весьма существенными, однако их можно учесть с помощью соответствующих методов [1539, 518, 1442, 1538, 1047].

К сожалению, для внутренних мембранных белков отсутствуют структурные данные высокого разрешения, поэтому точная интерпретация спектров КД невозможна. За исключением нескольких случаев, разные спектральные методы не использовались для изучения одного и того же белка и количественное сравнение результатов не проводилось. Интересно, что для бактериородопсина, который исследовали методами КД, ИК и ЯМР, во всех трех случаях были получены одинаковые результаты, свидетельствующие о значительном содержании в этом белке β -слоев (разд. 3.5.2). Тем не менее у каждого метода имеются существенные недостатки. Так, данные о высоком содержании в бактериородопсине β -слоев (~46%) [518] в значительной мере зависят от способа учета оптических артефактов [1047, 1526]. Судя по данным электронно-микроскопической реконструкции, характеризующимся относительно низким разрешением (разд. 3.4.2), в бактериородопсине 80% приходится на долю α -спиралей, а β -слои отсутствуют совсем [620]. Чтобы понять причину этих несоответствий, необходимо провести структурный анализ белка с атомным разрешением. Имеются еще два белка, пронизывающие мембрану, с высоким содержанием β -структур: порин, присутствующий в наружной мембране *E. coli* [737] (разд. 3.5.3), и α -токсин *Staphylococcus aureus* [1457]. Оба этих белка участвуют в образовании пор в биолог. (гл. 8).

2. *Инфракрасная спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния*. Эти методы не только позволяют получить сведения о конформации мембранных липидов (гл. 2), но и могут использоваться для исследования вторичной структуры белков [1590]. Колебательный спектр полипептидного остова зависит от типа вторичной структуры и дает информацию о содержании в молекуле α - и β -структур. Этими методами можно исследовать высушенные на воздухе пленки, водные суспензии мембран, а также очищенные белки как в присутствии детергента, так и в составе реконструированных везикул [1513, 32]. Например, по данным ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье комплекс Ca^{2+} -АТФазы в мембране состо-

ит в основном из α -спиральных участков и участков, имеющих конформацию статистического клубка [832], а гидрофобный белок миеллин (липофиллин) в реконструированных везикулах имеет как α -, так и β -участки [1414].

3. ЯМР-спектроскопия также может использоваться для изучения мембранных белков. Однако возможности метода в этом случае ограничены, что связано главным образом с относительно медленными движениями интегральных мембранных белков *in situ* и в комплексах с детергентом. Поэтому такой мощный метод, как двумерный ЯМР, который может дать детальную картину конформационного состояния сравнительно небольших белков в растворе, пока непригоден для изучения мембранных белков. Более приемлем метод ЯМР твердых образцов. Большими возможностями обладают методы ^2H - и ^{13}C -ЯМР, хотя до сих пор они применялись не очень широко. Получены данные об усредненной конформации остова [850] и динамике боковых цепей (гл. 5). Следует отметить, что методы ЯМР твердого состояния не только не используются широко, но в большинстве случаев их и нельзя использовать. Тем не менее в тех редких ситуациях, когда их применение оказывается возможным (например, при исследовании бактериородопсина [850]), они являются очень ценными.

3.3.5. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

Одним из наиболее важных методов характеристики очищенных мембранных белков несомненно является определение биохимической активности. При этом используются в основном такие же критерии, как и для растворимых белков, но могут возникать и свои трудности. Первая из них связана с тем, что биохимическая активность мембранных белков часто очень сильно зависит от связывания с белком липидов и детергентов. Потеря активности может быть как обратимой, так и необратимой. Целесообразно иметь какую-то оценку удельной активности исследуемого белка *in vivo* или в составе мембран до солюбилизации. Избыток детергента может оказывать ингибирующий эффект, например за счет разбавления неполярных субстратов в популяции мицелл и уменьшения ферментативной активности. Измеряя активность любого мембранного белка, необходимо иметь в виду, что *in situ* он находится в окружении липидов, обеспечивающих оптимальную активность. Вторая проблема связана с белками, обладающими «трансмембранной» активностью; примерами могут служить белки, образующие каналы, и транспортные белки (гл. 8). В этих случаях необходимо учитывать перемещение растворенных веществ из одного компартмента в другой (например, внутрь липосом и наружу). Подробно эти проблемы обсуждаются в гл. 6.

3.3.6. ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА И ХИМИЧЕСКОЕ СШИВАНИЕ

Многие мембранные ферменты представляют собой комплексы, состоящие из нескольких субъединиц. В качестве примера можно привести H^+ -АТФазу, Na^+/K^+ -АТФазу, митохондриальные комплексы электронного транспорта и фотосинтетические реакционные центры. Некоторые интегральные мембранные белки прочно связаны с растворимыми белками с помощью нековалентных взаимодействий (примерами могут служить F_0 - и F_1 -компоненты митохондриальной H^+ -АТФазы; [476]). В *E. coli* F_0 -компонент, содержащий по данным электрофореза в ПААГ-ДСН три типа субъединиц (а, b, c), образует протонный канал, а F_1 , состоящий из пяти типов субъединиц, содержит активный центр, участвующий в гидролизе АТФ [476]. Для таких белков очень важно определить характер субъединиц, стехиометрию комплекса и ближайшие взаимодействия его компонентов. Это весьма непростая задача даже тогда, когда белковый комплекс уже изолирован. Возникающие здесь проблемы по существу не отличаются от таковых для растворимых белковых комплексов, но имеются и свои дополнительные сложности.

Прежде всего следует иметь в виду, что взаимодействие между субъединицами очень сильно зависит от типа липидов и детергентов, с которыми связаны белки [1221, 238]. Например, сукцинатдегидрогеназа *E. coli* при солюбилизации ее с помощью луброла РХ представляется состоящей из четырех субъединиц, а при солюбилизации большинством других детергентов, в том числе тритоном X-100, — только из двух [238]. Известно, что оперон *sdh* кодирует все четыре полипептида, а форма из двух субъединиц имеет аномальный спектр ЭПР. Таким образом, ясно, что *in vivo* фермент состоит из четырех субъединиц. Однако сукцинатдегидрогеназой активностью обладают обе формы, поэтому используемые биохимические критерии важны для заключения, была ли солюбилизована правильная форма.

Еще одна проблема связана с тем, что в бислой мембранные белки могут образовывать комплексы из-за высокой их локальной концентрации [540]. При солюбилизации же независимо от используемого детергента может произойти разбавление мембранных белков и их разъединение. По закону действующих масс это приведет к диссоциации комплексов, в которых взаимодействие между компонентами не очень сильное. Часто бывает трудно определить, какой комплекс образуется *in situ*, а какой — при солюбилизации и очистке. Подобные проблемы возникают при исследовании многих сложных систем, например системы β -адренергетический рецептор—аденилатциклаза, цепи электронного транспорта у митохондрий, системы микросомных цитохромов P450 и b_5 (гл. 6).

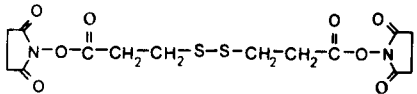
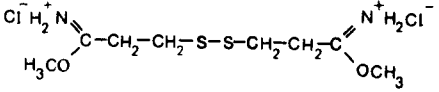
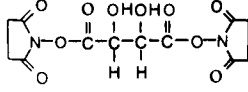
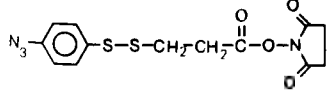
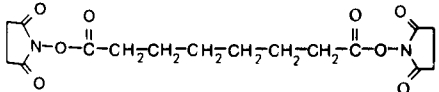
Для изучения стехиометрии субъединиц и их ассоциации в очищенном комплексе используется всего несколько методов: 1) химиче-

ское сшивание; 2) количественный анализ N-концевых аминокислот; 3) определение отношения массы субъединиц в ДСН-полиакриламидных гелях путем определения интенсивности окрашивания, с помощью радиоавтографии или иммуноблоттинга. Каждый метод имеет свои ограничения, но все они использовались на практике. Например, стехиометрию пяти субъединиц никотинового ацетилхолинового рецептора ($\alpha/\beta/\gamma/\delta/\epsilon = 2:1:1:1:1$) определяли с помощью количественного анализа N-концевых аминокислот [1189] (см. разд. 8.2.4), а трех субъединиц F_0 -компонента H^+ -АТФазы *E. coli* ($a/b/c = 1:2:10$) — с помощью разделения в ДСН-полиакриламидных гелях [452] (см. разд. 8.4.2). Заметим, что кумасси бриллиантовый синий, обычно используемый для окрашивания белков после разделения в ПААГ-ДСН, связывается предпочтительнее с белками, содержащими основные аминокислотные остатки [1424], и существуют примеры сильно неполярных внутренних мембранных белков, которые лишь едва окрашиваются.

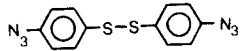
Химическое сшивание применялось для определения близких взаимодействий как в очищенных белковых комплексах, так и в комплексах *in situ* [480]. Для анализа близких взаимодействий в мембранных белках используется несколько специфических гидрофобных сшивающих агентов. Некоторые из них представлены в табл. 3.4. Применяемые методы не отличаются от таковых для растворимых систем. Продукты сшивания обычно анализируют с помощью электрофореза в ПААГ, часто с использованием расщепляемых сшивающих агентов, что позволяет анализировать полипептиды. Применяют также антитела к индивидуальным полипептидам для иммуноблоттинга после электрофореза в ПААГ-ДСН, чтобы идентифицировать компоненты каждого из образовавшихся продуктов. Можно было бы предположить, что при относительно большом времени жизни реагентов белки в биомембранах будут сшиваться в результате простой диффузии в бислое. Однако, по данным нескольких работ, это не так: продукты сшивания представляют собой специфические белковые ассоциаты, а не случайные образования. Так, в фотосинтетической мембране *Rhodospirillum rubrum* образуются сшивки лишь между субъединицами компонентов реакционного центра, а также между реакционным центром и «антенным» комплексом B870, участвующим в передаче энергии реакционному центру [1143].

И наконец, отметим, что химическое сшивание часто использовалось для идентификации интегральных мембранных белков, которые связываются с известными растворимыми компонентами. В качестве примера можно привести сшивание 1) а- и b-субъединиц F_0 -компонента H^+ -АТФазы с β -субъединицей растворимого компонента F_1 [49]; 2) цитохрома с с субъединицами митохондриальной цитохром с-оксидазы [480]; 3) пептидных гормонов (например, инсулина) с рецепторами гормонов [1159].

Таблица 3.4. Некоторые сшивающие реагенты, использовавшиеся для определения четвертичной структуры мембранных белков ¹⁾

Сшивающий реагент	Комментарии
(1) Дитиобис(сукцинимидилпропионат) (ДСП)	Гомобифункциональный, расщепляемый, аминокреактивный при физиологических pH. Умеренно полярный, длина 12 Å [49, 1143]
	
(2) Диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат · 2HCl (ДТПП)	Гомобифункциональный, расщепляемый, аминокреактивный при pH 9. Заряженный, но проникает через мембраны. Длина 12 Å [49, 1143]
	
(3) Дисукцинимидилтартрат (ДСТ)	Гомобифункциональный, расщепляемый периодатом, аминокреактивный при физиологических pH. Полярный, незаряженный, длина 6 Å [49]
	
(4) N-Сукцинимидил (4-азидо-фенил)1,3'-дитиопропионат (САДП)	Гетеробифункциональный, фотоактивируемый, расщепляемый [1143]
	
(5) Дисукцинимидилсуберат (ДСС)	Гомобифункциональный, аминокреактивный при физиологических pH [1159]
	

Продолжение табл. 3.4

Сшивающий реагент	Комментарии
(6) 4,4'-Дитиобисфенилазид (ДТБФА)	Неполярный, фотоактивируемый, расщепляемый [49]
	
¹⁾ Дополнительная информация и данные о других реагентах приводятся в Pierce Chemical Company Handbook and Catalog и в работе [480].	

3.4. Изучение трехмерной структуры с помощью рентгеновской дифракции и реконструкции изображения

3.4.1. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Наиболее детальную структурную информацию об очищенных мембранных белках можно получить, исследуя методом рентгеновской дифракции трехмерные белковые кристаллы. К сожалению, оказалось, что интегральные мембранные белки очень трудно кристаллизовать. Будучи удалены из своего естественного липидного окружения, неполярные участки липидных молекул склонны агрегировать с образованием неупорядоченных форм, непригодных для кристаллографического анализа. Ясно, что необходимы специальные методы, позволяющие обойти эти трудности, и в этом был достигнут определенный прогресс. Михель обратил внимание, что мембранные белки образуют кристаллы двух типов (рис. 3.2). Кристаллы типа I напоминают стопки мембран. В них осуществляется латеральное взаимодействие между неполярными участками, а мембраноподобные слои связывают полярные участки белков. Подобные кристаллы были получены для нескольких белков, но ни в одном случае их нельзя было исследовать с помощью дифракции с высоким разрешением. Кристаллы типа II стабилизируются за счет контактирования полярных участков белковых молекул, а небольшие амфифильные соединения или детергенты в основном заполняют промежутки между ними. Заметим, что очень важными являются размер, заряд и другие свойства детергентов; если эти параметры неблагоприятны, то детергент может дестабилизировать кристаллическую структуру. Кристаллы типа II образуют белки фотосинтетического

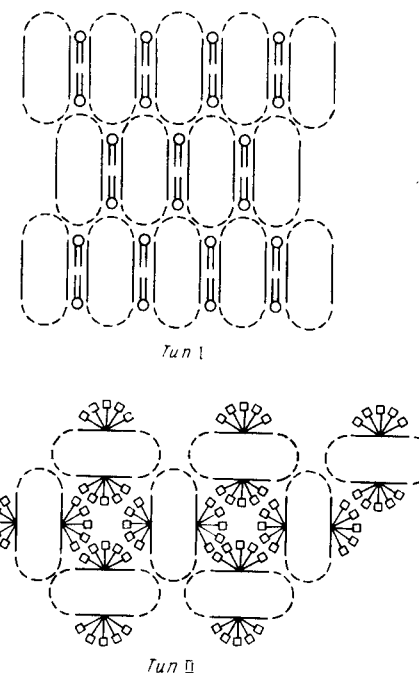


Рис. 3.2. Два основных типа кристаллов мембранных белков. Кристаллы типа I представляют собой двумерные стопки, упорядоченно расположенные в третьем измерении. В кристаллах типа II с гидрофобными поверхностями белков связаны молекулы детергента. Пунктиром отмечены гидрофильные домены белков. (Из работы [979].)

реакционного центра *Rhodospseudomonas viridis* [980, 319]. В табл. 3.5 перечислены интегральные мембранные белки, которые удалось кристаллизовать. Однако не все эти кристаллы пригодны для структурных исследований. До сих пор с высоким разрешением была установлена структура только одного из классов мембранных белков — фотореакционного центра бактерий (разд. 3.5.1). Имеются данные, что близка к завершению работа по установлению структуры матричного порина (белка OmpF) с высоким разрешением из наружной мембраны *E. coli* (разд. 3.5.3).

Итак, мембранные белки можно кристаллизовать, и хотя число успешных попыток пока невелико, можно сделать несколько выводов, касающихся методологии кристаллизации.

1. Белки кристаллизуются вместе с детергентом.
2. Очень важен выбор детергента. По-видимому, наиболее пригодны цвиттерионные или неионные детергенты с высокой ККМ и малым размером мицелл [491].

Таблица 3.5. Мембранные белки, которые были закристаллизованы

Белок	Ссылки
1. Реакционный центр <i>R. viridis</i> ¹⁾	[980, 319]
2. Реакционный центр <i>R. sphaeroides</i> ¹⁾	[19, 17, 18]
3. Реакционный центр фотосистемы I цианобактерий <i>Phormidium laminosum</i>	[448]
4. OmpF (матриксный порин) (наружная мембрана <i>E. coli</i>) ¹⁾	[490]
5. OmpA (коильогин) (наружная мембрана <i>E. coli</i>) ¹⁾	[491]
6. LamB (мальтопорин) (наружная мембрана <i>E. coli</i>)	[491]
7. Бактериородопсин (<i>H. halobium</i>)	[978]

¹⁾ Можно исследовать методом рентгеновской дифракции.

3. Кристаллизация облегчается в присутствии малых амфифильных органических молекул, по-видимому влияющих на полярные концевые группы детергента [979]. Так, белок реакционного центра *R. viridis* удалось закристаллизовать в присутствии 1,2,3-гептантриола.

4. Полиэтиленгликоль и сульфат аммония, обычно использующиеся при кристаллизации растворимых белков, применялись и для индукции кристаллизации мембранных белков [1562].

В работе [491] отмечалось, что условия кристаллизации в некоторых случаях близки к условиям, при которых детергент образует отдельную фазу. Роль, которую играет агрегация детергента в процессе кристаллизации белково-детергентных комицелл, неизвестна, но очевидно, что правильный выбор детергента очень важен.

3.4.2. РЕКОНСТРУКЦИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ И ДВУМЕРНЫЕ КРИСТАЛЛЫ

Трехмерные кристаллы мембранных белков получить очень трудно, но многие из них образуют двумерные упорядоченные структуры. В некоторых случаях белки формируют такие структуры *in vivo* (например, бактериородопсин в пурпурной мембране). При подходящих условиях такие белки, как и многие другие, образуют «двумерные кристаллы» при их очистке и реконструкции в присутствии фосфолипидов. Подобные двумерные упорядоченные структуры можно использовать для получения трехмерной структурной информации с

помощью электронной микроскопии и методов реконструкции изображения [1480].

Дополнение 3.1. Реконструкция изображения

Эта методика исходно предназначалась для изучения вирусных частиц [261], а к мембранным белкам она была впервые применена Хендерсоном и Ануином [620], исследовавшими бактериородопсин. В принципе этот метод позволяет получить структурную информацию, достаточную для того, чтобы проследить ход полипептидной цепи, но реализовать эту возможность пока не удалось. Рассеяние электронов достаточно велико для того, чтобы визуализировать отдельные молекулы с помощью электронного микроскопа. Однако интенсивность пучка электронов, необходимая для этого, слишком велика, сам образец при этом разрушается, и для получения высокого разрешения приходится использовать гораздо меньшие интенсивности. В обычной трансмиссионной электронной микроскопии для усиления контраста используется негативное контрастирование, но оно непригодно для выявления структурных деталей тех участков белка, которые погружены в бислой, поскольку они недоступны для красителя. Красители редко используются для реконструкции изображения; исключения составляют лишь исследования по визуализации водных каналов.

Чтобы получить достаточную информацию с помощью пучка электронов низкой интенсивности, необходимо просуммировать изображения многих молекул. Именно с этой целью используют двумерные упорядоченные структуры. Сами изображения представляют собой двумерные проекции электронной плотности образца. Проведя оцифровку этих изображений и применив преобразование Фурье, можно выявить повторяющиеся элементы и устранить шумы. Еще раз применив преобразование Фурье к этим повторяющимся элементам, реконструируют исходное изображение, но уже без шумов. В основе процедуры лежит удачный прием, позволяющий суммировать изображения, полученные от сотен и тысяч молекул в поле зрения микроскопа.

Проекция электронной плотности в двух направлениях недостаточна для построения трехмерной структуры. Поэтому, наклоняя образец, получают проекции образца под разными углами и используют их для реконструкции трехмерного изображения объекта [1480]. Таким образом строят карту электронной плотности в мембране на разных уровнях. Обычно приводят данные о профиле электронной плотности через каждые 15–25 Å.

Таблица 3.6. Мембранные белки, структуру которых определяли методом реконструкции изображения

Белок	Трехмерное разрешение, Å	Ссылки
1. NADH: убихинон оксидоредуктаза (митохондрии)	13	[113]
2. Цитохром с-оксидаза (митохондрии)	20	[314, 466]
3. Убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза (митохондрии)	25	[843]
4. Светособирающий комплекс, содержащий хлорофиллы <i>a</i> и <i>b</i>	16	[795]
5. Фоторецепторная единица <i>R. viridis</i> ¹⁾	20	[1381]
6. Коннексин (белок щелевых контактов)	18	[1481]
7. Ацетилхолиновый рецептор	17	[149, 1633, 760, 119]
8. OmpF (матриксный порин)	23	[384]
9. Na ⁺ /K ⁺ -АТРаза	20	[1109, 1005]
10. Бактериородопсин	6,5	[620, 981]
11. Родопсин (бычий)	20	[346]

¹⁾ Этот комплекс состоит из реакционного центра, структура которого была получена с высоким разрешением, и трех полипептидов, формирующих светособирающий комплекс.

В табл. 3.6 представлен список белков, которые были изучены этим методом. Во всех случаях, кроме бактериородопсина, уровень разрешения был достаточен только для очерчивания общих контуров молекул и определения их размеров. Однако даже такая информация может быть очень ценной. Например, выяснилось, что многие из этих молекул в двумерных кристаллах существуют в виде отдельных мультимеров, а порин и бактериородопсин являются тримерами. В случае порина существует четко наблюдаемый канал, в образовании которого на внешней поверхности клетки участвует каждый из трех отдельных полипептидов; сливаясь, эти полипептиды образуют одиночный канал на периплазматической поверхности наружной мембраны *E. coli* [384] (см. разд. 8.2.3). Коннексин выглядит как гексамер [1481], а ацетилхолиновый рецептор — как симметричный пентамер [149] (см. разд. 8.2). Ферменты дыхательной цепи митохондрий, убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза [843] и цитохромоксидаза [314, 466], являются димерами, хотя неясно, существуют ли эти димеры *in vivo*. Удивительно, как сильно белки иногда выступают над поверхностью бислоя. Например, отдельные части цитохром с-оксидазы возвышаются над поверхностью бислоя на 50 Å

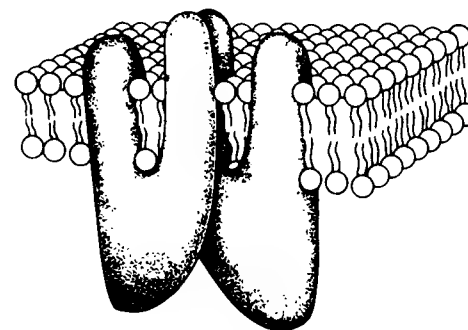


Рис. 3.3. Модель димера митохондриальной цитохром с-оксидазы, построенная с использованием метода реконструкции изображения. Каждый Y-образный мономер состоит по крайней мере из 12 полипептидных субъединиц. Верхняя поверхность бислоя обращена в матрикс; основная часть белковой молекулы выступает в межмембранное пространство (нижняя часть рисунка). Положение липидных молекул в пространстве между ветвями буквы Y точно неизвестно. (Из работы [466].) Рисунок любезно предоставлен д-ром Т. Frey.

[314, 466] (рис. 3.3); такая же картина наблюдается для ацетилхолинового рецептора [149] (рис. 8.8). Напротив, порин [384] и бактериородопсин [620] почти не выдаются над поверхностью мембран. На рис. 3.3 представлена структура цитохром с-оксидазы, полученная с низким разрешением.

3.5. Три примера структурных исследований мембранных белков

Рассмотрим три примера изучения интегральных мембранных белков, иллюстрирующие большое разнообразие используемых для этого методов. Наиболее известными структурами являются реакционные центры *R. viridis* и *R. sphaeroides*, исследование которых с помощью рентгеновской дифракции было весьма успешным. Еще одна наиболее полно изученная структура — бактериородопсин *H. halobium*; для его исследования применялся метод реконструкции изображения, а также другие подходы. Порин и родственные белки наружной мембраны *E. coli* изучали в основном с помощью генетических и молекулярно-биологических методов, позволяющих идентифицировать функционально важные участки.

3.5.1. СТРУКТУРА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ *R. VIRIDIS* И *R. SPHAEROIDES*

Фотосинтетические реакционные центры представляют собой комплексы белков с пигментами; в них происходит первичное разделение зарядов в фотосинтетических мембранах [318]. Лучше всего охарактеризованы комплексы из пурпурных несерных бактерий; они обычно состоят из трех белковых субъединиц — Н (тяжелой), М (средней) и L (легкой). Реакционный центр *Rhodopseudomonas viridis* имеет также четвертую субъединицу — цитохром с-типа. Протестическими группами этого комплекса являются четыре гемогруппы, четыре бактериохлорофилла *b*, два бактериофеофитина, одно негемовое железо (не железо-серный центр), один менахинон (Q_A) и один убихинон (Q_B). Под действием света электрон переходит от первичного донора электронов, так называемой «специальной пары» — молекул бактериохлорофилла, образующих димер, к бактериофеофитину, а затем к первичному хиноновому акцептору Q_A . В конце концов электрон восстанавливает вторичный акцептор Q_B в ходе реакции, при которой протоны поступают из раствора на восстановленный хинон (рис. 3.4). Q_B находится в равновесии с хинонным пулом в бислое. Окисленный первичный донор электронов, «специальная пара», восстанавливается цитохромом с-типа. Поскольку цитохром и хинон расположены на противоположных сторонах фотосинтетической мембраны, светозависимый электронный транспорт электрогена и генерирует трансмембранную разность потенциалов.

Суммарная мол. масса реакционного центра из *R. viridis* [980, 319, 318, 982, 983] составляет примерно 150 000, а кажущаяся мол. масса субъединиц (по данным электрофореза в ПААГ-ДСН) — 38 000 (цитохром, 333 аминокислотных остатка), 35 000 (Н, 258 остатков), 28 000 (М, 323 остатка) и 24 000 (L, 273 остатка). Заметим, что электрофорез в ПААГ-ДСН дает неправильные молекулярные массы для Н (тяжелой), М (средней) и L (легкой) субъединиц; об этом свидетельствуют данные о числе аминокислотных остатков в каждом полипептиде, полученные при секвенировании ДНК [319]. Очищенный комплекс был закристаллизован [979] с использованием сульфата аммония как осаждающего агента в присутствии детергента N,N-диметилдодecilамин-N-оксида (табл. 3.1) и органического амфифильного соединения гептан-1,2,3-триола. Кристаллы были в достаточной степени упорядочены и фотохимически активны. Структура этого четырехсубъединичного белка была установлена с разрешением около 3 Å. Детергент в кристаллах не упорядочен, поэтому невозможно точно определить положения границ погруженных в мембрану участков. Размеры комплекса — $30 \times 70 \times 130$ Å. L- и М-субъединицы содержат по пять трансмембранных α -спиральных участков, а у Н-субъединицы такой участок только один. Итак, все трансмембранные области этого белкового комплекса имеют α -спиральную конфи-

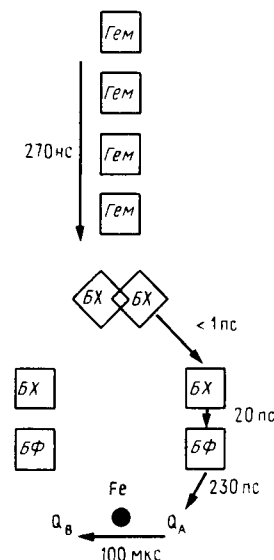


Рис. 3.4. Схематическое представление окислительно-восстановительных протестических групп фотосинтетического реакционного центра *R. viridis*. Цитохромная субъединица содержит четыре гема, расположенные на периплазматической стороне мембраны. Поток электронов, инициированный светом (стрелки), направляется от гемов к «специальной паре» (димеру бактериохлорофилла) (БХ-БХ), далее к другому бактериохлорофиллу (БХ), бактериофеофитину (БФ), связанному хинону (Q_A), негемовому железу (Fe) и, наконец, к терминальному хинону Q_B . Указано характерное время каждой стадии. Заметим, что используется только один из двух почти равнозначных путей. (Из работы [318].)

гурацию. Длина каждого α -спирального сегмента составляет примерно 40 Å, этого достаточно для пересечения мембраны.

Структура белкового комплекса из *R. viridis* напоминает сэндвич (рис. 3.5). L- и М-субъединицы уложены одинаковым образом и расположены в центре сэндвича. Они пересекают бислой и связаны со всеми протестическими группами, за исключением гемов. Сегменты L и М, которые соединяют трансмембранные сегменты по обе стороны мембраны, участвуют в связывании цитохрома и Н-субъединицы. Цитохром образует «шапочку» (кэп) на наружной (периплазматической) поверхности бислоя, а гидрофильная часть субъединицы Н — аналогичную структуру на цитоплазматической поверхности. Трансмембранная α -спираль на N-конце Н-субъединицы контактирует с цитохромом на противоположной стороне мембраны. Эти межмолекулярные взаимодействия в кристаллах осуществляются между

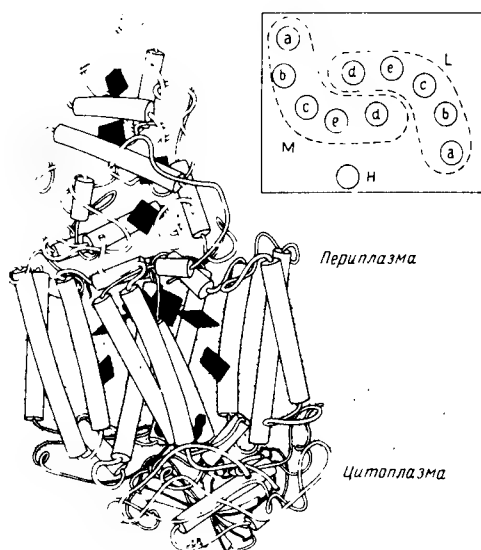


Рис. 3.5. Схематическое изображение полипептидного остова четырех субъединиц реакционного центра *R. viridis*. Одинадцать пронизывающих мембрану α -спиралей представлены в виде цилиндров, а простетические группы — в виде черных прямоугольников. Точные границы липидного бислоя неизвестны, положение мембраны указано приблизительно. Рисунок любезно предоставлен д-ром Jane Richardson. Вверху справа показано расположение одинадцати пронизывающих мембрану спиралей (вид сверху) [618].

участками Н-субъединицы и цитохромом, которые в норме контактируют с водой (кристаллы типа II, рис. 3.2). Возможно, эти два белка, образующие гидрофильные «шапочки», способствуют формированию высокоупорядоченных кристаллов.

Отметим некоторые важные структурные особенности рассматриваемого комплекса.

1. Все 11 трансмембранных участков представляют собой α -спирали (рис. 3.5 и 3.6), а составляющие их аминокислоты в большинстве своем неполярны. В каждой из трансмембранных спиралей L- и М-субъединиц имеется последовательность длиной не менее 19 остатков, не содержащая никаких кислых или основных аминокислот [982].

2. Трансмембранные спирали (обозначаемые a, b, c, d, e) в каждой из субъединиц L или М обычно антипараллельны своим соседям, но спирали с и e параллельны друг другу. Наклон спиралей к нормали к плоскости мембраны не превышает 25° , за исключением спирали

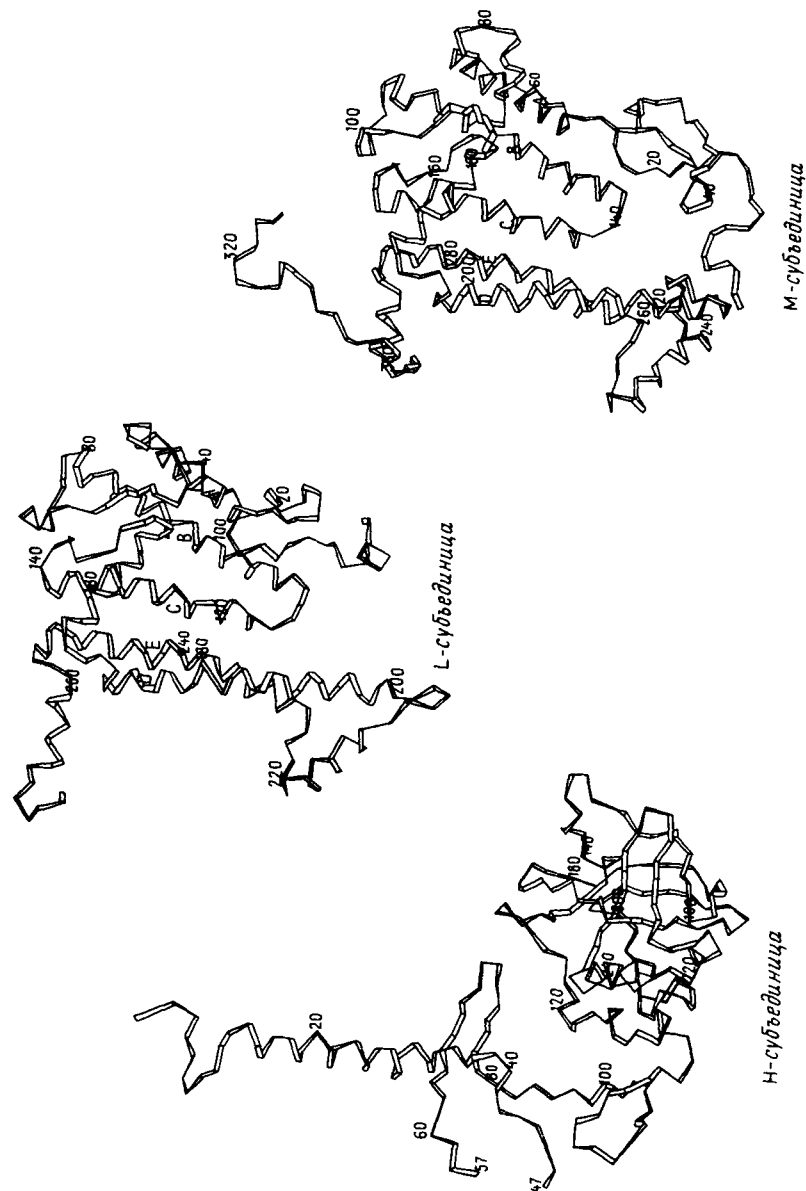


Рис. 3.6. Изображение трех трансмембранных полипептидов, L, М и Н, фотосинтетического реакционного центра *R. viridis*. Рисунок любезно предоставлен д-рами Н. Michel и R. Huber.

d (в L и M), которая наклонена к нормали под углом 38° . Длина спиралей варьирует от 24 до 30 остатков.

3. Те участки L- и M-субъединиц, которые соединяют трансмембранные сегменты, образуют уплощенные структуры по обе стороны мембраны, которые могут контактировать с двумя гидрофильными субъединицами.

4. Заряженные аминокислоты в субъединицах L и M распределены асимметрично, так что полярные концы трансмембранных спиралей и соединяющие их участки заряжены более отрицательно на периплазматической стороне мембраны, чем на цитоплазматической. Это создает определенные энергетические выгоды, поскольку мембранный потенциал отрицателен на цитоплазматической стороне [982].

5. Наиболее тесные контакты между субъединицами L и M осуществляются на цитоплазматической стороне, у поверхности контакта H. В этой области спирали двух субъединиц интеркалируют и негемовое железо оказывается связанным с четырьмя спиралями, по две спирали от L- и M-субъединиц [983].

Все эти структурные данные ценны также в том отношении, что они помогают понять фотохимию этого важного комплекса [318, 983].

1. Хотя редокс-центры, по-видимому, создают два параллельных пути переноса электронов от «специальной пары», эти две ветви не идентичны [983], и при переносе электронов через мембрану, вероятно, используется только одна из них. Фотосинтетические пигменты жестко фиксируются в определенном месте за счет гидрофобных взаимодействий и водородных связей с белком [983] и вряд ли перемещаются во время реакции.

2. Перенос электрона от «специальной пары» к бактериофеофитину происходит очень быстро (менее чем за 20 пс); это согласуется с тем, что участвующие в процессе простетические группы находятся друг от друга на расстоянии вандерваальсового радиуса (рис. 3.4). Характерное время переноса электрона от бактериофеофитина к Q_A составляет 230 пс, и центры этих двух групп разделены расстоянием около 14 Å. Однако изопреноидная боковая цепь хинона непосредственно контактирует с бактериофеофитином.

3. Перенос электрона от цитохрома, сопровождающийся восстановлением специальной пары, происходит медленно, за 270 нс, в соответствии с тем, что центр ближайшего гема расположен от центра специальной пары на расстоянии 21 Å. Из-за этого, в частности, замедляется перенос электрона.

4. Перенос $Q_A \rightarrow Q_B$ может осуществляться при участии негемового железа, хотя оно, по-видимому, не является необходимым для этого процесса [318]. Хинон Q_B связывается слабо и утрачивается в процессе приготовления образца. Возможно, функциональная роль H-субъединицы состоит в связывании Q_B .

Структура трехсубъединичного реакционного центра *Rhodobacter sphaeroides*, также установленная методом рентгеновской дифракции с разрешением 2,8 Å, очень похожа на структуру реакционного центра *R. viridis* [1619, 17, 18]. Модельные исследования [1619] позволяют предположить, что негемовое железо и хиноны расположены на уровне полярных концевых групп фосфолипидов внутри бислоя, хотя они полностью окружены белками. Специальная пара бактериохлорофилла находится примерно на 5 Å ниже полярных липидных головок. Одиннадцать трансмембранных спиралей упакованы столь же плотно, как аминокислотные остатки внутри водорастворимых белков. Те аминокислотные остатки в трансмембранном участке, которые контактируют с белком, обычно гидрофобны; такая же картина характерна и для соответствующих аминокислот водорастворимых белков. Полярные связи между трансмембранными спиралями (водородные связи или солевые мостики) весьма немногочисленны. Трехсубъединичная структура стабилизируется за счет: 1) взаимодействия между экспонированными наружу участками субъединиц; 2) благоприятных диполь-дипольных взаимодействий между антипараллельными плотноупакованными α -спиралями (d и e); 3) вандерваальсовых взаимодействий между плотноупакованными спиралями; 4) связывания одного атома железа с четырьмя гистидиновыми остатками d- и e-спиралей L- и M-субъединиц. Отсутствием полярных взаимодействий между трансмембранными спиралями этот комплекс отличается от большинства моделей бактериородопсина, обсуждаемых в следующем разделе.

В заключение отметим, что реакционные центры бактерий сходны с реакционными центрами фотосистемы II высших организмов, которые ответственны за окисление воды и выделение кислорода [69, 982]. Некоторые особенности фотосинтетических электронтранспортных цепей обсуждаются в разд. 6.6.

3.5.2. СТРУКТУРА БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Бактериородопсин — это наиболее исследованный мембранный белок; установление его структуры оказало большое влияние на наши представления о строении других интегральных мембранных белков [1394, 1108]. Бактериородопсин обнаружен в морской археобактерии *Halobacterium halobium*. Он присутствует в специализированных бляшках бактериальной цитоплазматической мембраны, называемой пурпурной мембраной, образуя там высокоупорядоченные двумерные структуры. Мол. масса бактериородопсина 27 000 (248 аминокислотных остатков). Он содержит единственную ковалентно связанную простетическую группу ретиналь, которая с помощью шиффова основания присоединена к лизину-216 [838]. Этот белок выполняет функцию фотохимического протонного насоса, создающего

разность электрохимического потенциала протонов, которая затем используется клеткой для транспорта растворимых веществ и синтеза АТФ. При поглощении ретиналем одного протона индуцируется ряд превращений, в том числе *транс-цис*-изомеризация по связи $C_{13}-C_{14}$ ретиналя и депротонирование азота шиффового основания; это приводит к электрогенному переносу одного или двух протонов из клетки наружу.

Поскольку *in situ* этот белок образует высокоупорядоченную двумерную кристаллическую решетку, для установления его трехмерной структуры можно использовать методы реконструкции изображения. Белок имеет относительно малые размеры и выполняет весьма важную функцию протонного насоса, а за всеми превращениями ретиналя можно следить оптическими методами. Все это стимулировало детальные исследования механизма функционирования бактериородопсина. Фотохимические свойства шиффового основания ретиналя изучены довольно хорошо, однако как они влияют на белок и что вызывает перемещение протонов — неизвестно. Структурные данные тоже не пролили свет на механизм функционирования белка, хотя и были предложены модели протонной «эстафеты» или цепочки трансмембранных водородных связей [1050] (см. разд. 8.5.2). С другой стороны, функционально-механистические исследования тоже не дали никаких указаний, которые помогли бы в интерпретации структурных данных.

Структурный каркас бактериородопсина был построен методом реконструкции изображения с использованием электронно-микроскопических данных; это случай наиболее успешного применения данного подхода [1480]. Карты электронной плотности позволяют получить разрешение лучше, чем 3,7 Å, в плоскости мембраны [609] и около 14 Å в плоскости, перпендикулярной бислой. На рис. 3.7 представлены одна из карт электронной плотности и соответствующая трехмерная модель. Белок состоит из тримеров, при этом каждый полипептид предстает в виде образования из семи цилиндров, пронизывающих мембрану и примерно перпендикулярных ее плоскости. Обычно считают, что эти цилиндры представляют собой α -спиральные участки белковой молекулы. Их длина по оценкам равна 45 Å, что согласуется с рентгеноструктурными данными о том, что толщина пурпурной мембраны составляет примерно 49 Å. Если полипептид действительно находится в α -спиральной конфигурации, то эта величина должна соответствовать 30 остаткам, поскольку расстояние между остатками вдоль оси α -спирали равно 1,5 Å. Следовательно, в семи предполагаемых α -спиралях содержится более 80% всех аминокислотных остатков. И действительно, как показывают данные КД, большая часть белковой молекулы находится в α -спиральной конфигурации [1539, 1047, 1526], хотя имеются также участки, образующие β -слои [518].

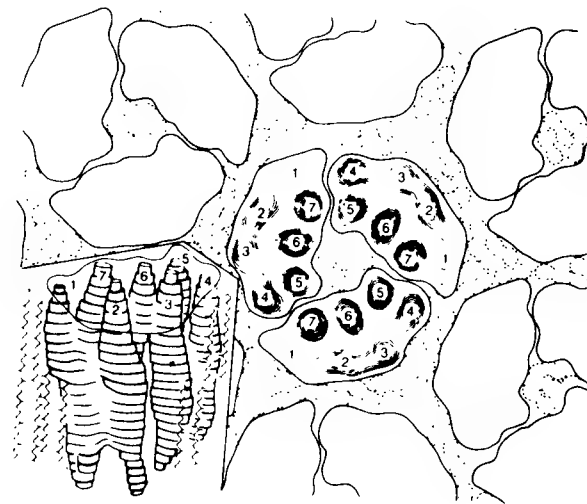


Рис. 3.7. Карта электронной плотности и трехмерная структура бактериородопсина, полученная методом реконструкции изображения. (Из работы [428].)

Разрешения метода реконструкции изображения недостаточно для того, чтобы проследить за ходом полипептидной цепи, и участки, соединяющие семь предполагаемых спиралей, в основном не видны. С 1980 г. было построено много моделей структуры бактериородопсина, согласующихся с дифракционными данными [386, 387, 1108, 731, 5, 1468], а также предприняты многочисленные попытки получить необходимую информацию с помощью других методов. До настоящего времени наиболее часто использовались: 1) определение аминокислотной последовательности [354, 745, 1107]; 2) протеолиз и иммунологические методы для выявления тех участков белка, которые находятся за пределами бислоя, и установления их ориентации относительно внутренней и наружной сторон мембраны [506, 1536, 753, 1108, 1110].

Все построенные модели сходны в интерпретации общей укладки и топологии молекулы. На рис. 3.8 представлена модель [355], аналогичная предложенной Энгелманом и др. [385]. Установлено, что для пересечения неполярной части бислоя (~33 Å) спираль должна содержать 21 аминокислотный остаток, и в белковой молекуле действительно имеется семь участков примерно такой длины с преобладающим содержанием неполярных аминокислот. Полагают, что они и образуют семь α -спиралей, наблюдаемых на карте электронной плотности. Эти α -спирали обычно обозначаются буквами А, В, С,

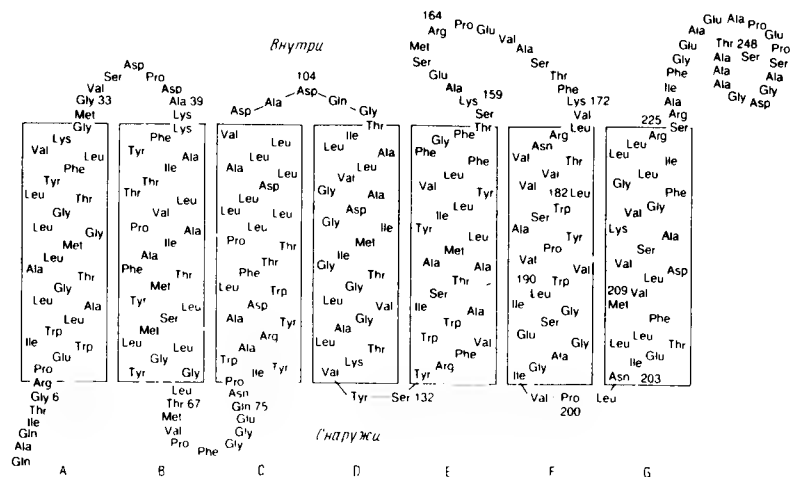


Рис. 3.8. Одна из моделей расположения в мембране бактериородопсина. Буквами А—G обозначены семь спиралей, начиная с N-конца. Участок связывания ретиналя изображен в соответствии с данными работы [662]. Модель сходна с предложенной Энгелманом и др. [385]. (Из работы [355].)

D, E, F, G, начиная с N-конца. Каково соответствие между ними и семью спиральями, выявленными с помощью электронно-микроскопических исследований (рис. 3.7), — неизвестно. Этот вопрос неоднократно обсуждался, и здесь существуют разные мнения. Почти не вызывает сомнений, что общая топология, представленная на рис. 3.8, адекватна [1468]. Разные модели, описанные в литературе, в каких-то отношениях могут существенно различаться. Это касается, в частности, длины нескольких спиралей, расположенных внутри бислоя, которая варьирует в разных моделях в пределах 10 остатков. Несмотря на эти разногласия, по главным особенностям достигнут консенсус, хотя говорить о единодушии нельзя. Эти особенности следующие.

1. Участки белка, пересекающие бислой, имеют форму α -спиралей и в целом неполярны. Спирали, вероятно, пронизывают всю толщу мембраны (~ 45 Å), а не только неполярную часть бислоя (~ 33 Å). Спирали перпендикулярны (или почти перпендикулярны) поверхности мембраны и упакованы так, что расстояние между их центрами составляет 10 Å.

2. Заряженные и полярные аминокислотные остатки расположены в основном в участках, соединяющих трансмембранные спирали. В той части белковой молекулы, которая погружена в неполярную

часть бислоя, имеется до девяти ионизируемых остатков в зависимости от того, где расположены его границы. По-видимому, для стабилизации структуры они должны быть каким-то образом нейтрализованы (разд. 3.6.3). Возможно, они образуют ионные или водородные связи с остатками, расположенными в другой части полипептидной цепи. Этот момент может оказаться полезным при обсуждении вопроса о характере упаковки разных спиралей в мембране [387]. По-видимому, ионизируемые остатки, располагающиеся внутри мембраны, имеют структурное и/или функциональное значение. Пример тому — остаток Lys-216, с которым связывается ретиналь. Большинство заряженных аминокислотных остатков, локализованных в экспонированных в раствор участках белка, располагаются вблизи цитоплазматической поверхности или непосредственно на ней.

3. Примерно в середине спиралей B, C и F расположены по три остатка пролина (Pro-50, 91, 186), однако спирали при этом не выглядят сильно изогнутыми.

4. Наблюдается асимметричное распределение ароматических аминокислот: многие остатки тирозина и почти все остатки триптофана находятся вблизи наружной стороны мембраны. Значение этого феномена неизвестно.

5. N-Конец располагается у наружной стороны мембраны, а C-конец — у внутренней.

6. C-Концевой участок, по-видимому, имеет форму статистического клубка (судя по данным КД) и может подвергаться протеолизу без нарушения функций белка [853, 1541].

7. Лизин-216 связан с простетической группой — ретиналем и расположен примерно в середине спирали G [715, 756].

Вывернутый белок

Относительно структуры бактериородопсина можно сделать весьма интересный вывод: его полипептидная цепь уложена так, что полярные или заряженные остатки, находящиеся в семи трансмембранных участках, оказываются обращенными внутрь глобулы, а неполярные контактируют с мембранными липидами. Глобула по существу «вывернута» [386], если сравнивать ее с белками, в которых большинство неполярных остатков спрятаны внутри структуры, а полярные обращены наружу. Этому есть разумное объяснение, и об этом же свидетельствуют некоторые экспериментальные данные, в первую очередь данные по рассеянию нейтронов. В основе упомянутого метода лежит существенное различие между рассеянием на атомах водорода и дейтерия. Дейтерированные валин и фенилаланин включали путем биосинтеза в бактериородопсин и затем, используя разностный метод Фурье, устанавливали распределение этих амино-

кислот в проектируемой структуре пурпурной мембраны. Приняв общепринятые допущения о последовательности предполагаемых спиральных участков, при построении соответствующей модели обнаружили, что если смотреть вдоль оси спирали, то для каждой спирали (A—G) остатки валина будут располагаться на сторонах, противоположных заряженным и полярным группам, а остатки фенилаланина — преимущественно на противоположной валину стороне. По данным нейтронного рассеяния, остатки валина преимущественно обращены к мембранным липидам, поэтому был сделан вывод, что заряженные и полярные остатки группируются внутри белка. Заметьте, что этот результат не зависит от конкретного расположения участков полипептида на электронно-микроскопической карте.

Другой подход основан на использовании гидрофобного фотореактивного зонда ^{125}I -ТИД (табл. 4.1). Этот реагент внедряется в гидрофобную сердцевину мембраны и при фотолизе неспецифически реагирует с наиболее доступными боковыми группами аминокислот. Это его свойство может использоваться для локализации тех участков белковой молекулы, которые обращены к липидам. По крайней мере в двух случаях, в том числе в случае бактериородопсина, отмечалось включение метки в специфические, периодически расположенные участки полипептидной цепи [653, 157], при этом метка включалась через каждые три или четыре остатка. Если такой характер метки отражает только долю боковых групп, обращенных к

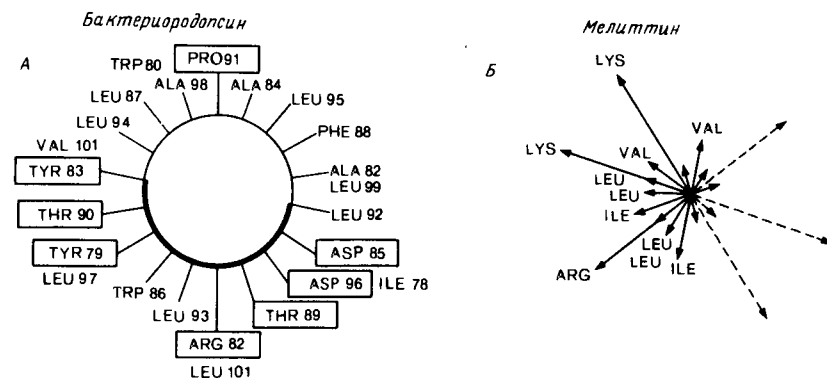


Рис. 3.9. Графическое представление амфифильных спиралей, вид вдоль оси спирали. А. Спираль С бактериородопсина (спиральное кольцо); гидрофильные остатки заключены в прямоугольные рамки. (Из работы [47].) Б. Векторное представление вкладов в гидрофобный момент, который дают остатки мелиттина с 5 по 22, составляющие амфифильный сегмент. Каждый остаток представлен вектором, длина которого пропорциональна гидрофобности этого остатка. Гидрофобность трех заряженных остатков (Lys, Lys и Arg) отрицательна; им соответствуют пунктирные векторы. Гидрофобный момент всего сегмента равен сумме векторов. (Из работы [375].)

мембранным липидам, то мы сможем установить, какая сторона предполагаемого α -спирального участка контактирует с липидами. Поскольку на один виток спирали приходится 3,6 остатка, то наблюдаемая периодичность может иметь место только в том случае, если зонд контактирует лишь с одной стороной спирали. Данные по спирали C (рис. 3.9) в бактериородопсине согласуются с представлением о вывернутой структуре этого белка и тоже свидетельствуют о том, что соответствующая часть полипептида имеет спиральную конфигурацию. В целом можно сказать, что концепция вывернутых интегральных мембранных белков весьма разумна, однако экспериментальное ее обоснование пока недостаточно. Напомним, что, согласно моделям фотосинтетического реакционного центра, в сердцевине бислоя находится очень мало ионизируемых остатков (разд. 3.5.1) или они отсутствуют там вообще.

Расположение спиралей в бислое и их соединение

Ситуация, которая сложилась при изучении бактериородопсина, весьма необычна в том смысле, что при промежуточном уровне разрешения удается установить некоторые структурные детали, но этого разрешения недостаточно для однозначного определения конфигурации белка в бислое. Все попытки, которые предпринимались здесь до сих пор, скорее смогли выявить ограничения использовавшихся методов, чем выяснить принципы структурной организации мембранных белков. Применялись следующие методы.

1. Теоретический анализ, направленный на поиск такой конфигурации спиральных участков, при которой происходит оптимальная нейтрализация зарядов благодаря образованию ионных связей внутри бислоя, а также на оценку длины полипептидных участков, соединяющих спирали [386].

2. Нейтронное рассеяние с использованием дейтерированных аминокислот и данных об аминокислотном составе каждого спирального участка [5].

3. Улучшение разрешения в плоскости мембраны с использованием метода реконструкции изображения и электронной дифракции [731].

4. Определение рентгеновского рассеяния до и после протеолитического расщепления N-концевого пептида с целью идентификации на карте электронной плотности остатков, расположенных на N-конце [1542].

5. Исследование с помощью нейтронного рассеяния бактериородопсина, реконструированного из протеолитических фрагментов, один из которых был дейтерирован [1468].

6. Нейтронное рассеяние с использованием дейтерированного ретиналя, включенного либо путем замещения [756], либо биосинтези-

чески [715, 1324]. Ретиналь был присоединен к Lys-216 в спирали G. Считается, что он расположен внутри бислоя под углом 75° по отношению к нормали (данные по линейному дихроизму), т. е. почти параллельно поверхности мембраны [628].

7. Фотохимическое сшивание с использованием фотореактивного производного ретиналя [662]. Этот метод позволяет выявить близкие взаимодействия.

Каждый из этих подходов имеет свои ограничения, и в этом смысле они не согласуются между собой. Существует 5040 (7!) возможных способов размещения семи спиралей (A—G) в семи бороздках (1—7), и до настоящего времени эти методы давали противоречивые ответы на вопрос даже о наиболее вероятном их расположении.

3.5.3. СТРУКТУРА ПОРИНОВ

Порины — это основной класс белков, обнаруженных в наружной мембране кишечных бактерий [1068, 579, 86] (см. также разд. 8.2.3). У *E. coli* и *Salmonella typhimurium* выявлены три порина: OmpF, OmpC и PhoE. Эти белки имеют мол. массу примерно 35 000 и гомологичные аминокислотные последовательности. Порины экстрагируются из наружной мембраны с помощью ДСН в виде стабильных тримеров; их можно встроить в фосфолипидные бислои с образованием неспецифичных пор, способных пропускать малые (<600 Да) гидрофильные молекулы. По-видимому, именно они придают наружной мембране бактерий свойство молекулярного сита, позволяя питательным веществам проникать внутрь клетки, а отходам — выводиться наружу через неспецифические каналы [1053].

Были проведены обширные структурные исследования белка OmpF, известного также под названием «матриксный порин»; в настоящее время осуществляется кристаллографический анализ, который позволит получить его структуру с высоким разрешением [490]. Однако уже сейчас можно сделать вывод, что структура OmpF сильно отличается от структуры как бактериородопсина, так и полипептидов, образующих фотосинтетический реакционный центр. Судя по данным о первичной последовательности, в молекуле нет никаких длинных гидрофобных участков, которые можно было бы идентифицировать как трансмембранные, и в среднем в ней содержится больше полярных аминокислот, чем неполярных [737, 1129, 1523]. Однако трехмерная электронно-микроскопическая реконструкция изображения с использованием кристаллических пластинок реконструированного порина показала, что белок пронизывает бислой, причем за пределы мембраны выходят лишь небольшие участки молекулы [384]. Методом негативного контрастирования были выявлены каналы, образуемые тримерами. Отдельные молекулы порина

образуют у внутренней поверхности каналы, которые в середине бислоя сливаются в одиночный канал, открывающийся наружу [384]. Есть и другие данные, свидетельствующие о том, что порин, несмотря на отсутствие в его молекуле гидрофобных участков, является трансмембранным белком [1129]. Иногда этот белок выполняет роль рецептора для бактериофага (для этого отдельные его участки должны быть экспонированы на наружной поверхности), а также проявляет родство к компонентам клеточной стенки на периплазматической стороне. Очищенный порин можно встраивать в фосфолипидные бислои с образованием потенциалчувствительных каналов (см. разд. 8.2.3).

Данные инфракрасной спектроскопии, кругового дихроизма и широкоугольной диффузионной рентгеновской дифракции свидетельствуют о том, что две трети длины молекулы образует β -слой, а на долю α -спиралей приходится небольшая часть длины молекулы [737, 1129, 1523]. Кроме того, эти исследования показывают, что β -цепи антипараллельны, ориентированы перпендикулярно плоскости мембраны и имеют среднюю длину 10—12 остатков, которых достаточно для пересечения неполярной области мембраны. Способ укладки β -цепей можно установить лишь с помощью рентгеновской дифракции. Как показывают модельные исследования, β -цепи могут быть уложены так, что образуется β -цилиндр, при этом полярные и заряженные аминокислотные остатки выстилают стенки наполненных водой каналов [1129, 1523] (см. рис. 8.7).

Все известные о структуре порина данные показывают, что гидрофобная α -спираль не является его необходимым трансмембранным элементом. Это означает, что наиболее распространенные способы предсказания структуры трансмембранных белков имеют свои ограничения, поскольку они основываются на предположении, что пересечь бислой могут только гидрофобные сегменты. Точная структура порина до сих пор неизвестна; неясно также, сходна ли она со структурой других мембранных белков. Впрочем, имеются и другие белки наружной мембраны бактерий, которые характеризуются высоким содержанием β -структур. Один из них — белок OmpA [1068, 1019], который тоже является рецептором для фагов, но, вероятно, не существует в виде отдельных тримеров и не образует поры. Другой белок такого рода — LamB (мальтопорин), являющийся рецептором бактериофага лямбда; он функционирует как специфичный канал, через который осуществляется диффузия мальтодекстринов ([1292, 1068]; см. также разд. 8.2.3).

Предположение о том, что необычная структура поринов связана с уникальной структурой и составом наружной мембраны бактерий, выглядит правдоподобно. Возможно, однако, что она обусловлена уникальностью способа образования больших водных каналов через бислой (гл. 8).

3.6. Принципы структурной организации мембранных белков и способы ее предсказания для трансмембранных белков

Как мы уже говорили, с высоким разрешением удалось установить структуру только одного класса мембранных белков — реакционного центра бактерий, однако и в этом случае положение белка относительно липидного бислоя не определено однозначно. Распространять принципы его организации на другие мембранные белки следует с осторожностью. Некоторую ясность может внести использование термодинамических принципов, а также учет того факта, что основная масса экспериментальных данных согласуется с предположением о высоком содержании в мембранных белках α -спиралей. Термодинамические факторы налагают определенные ограничения на то, какого типа белково-липидные структуры могут быть стабильными.

3.6.1. МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ — ЭТО АМФИФИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Любые мембранные белки, непосредственно контактирующие с гидрофобной сердцевинной липидного бислоя, должны быть амфифильными. Те участки полипептида, которые экспонированы в растворитель, скорее всего обогащены полярными и ионизируемыми аминокислотными остатками, а остатки, контактирующие с липидными углеводородными цепями, должны быть в основном неполярными. Все это логически следует из энергетических принципов, рассмотренных в разд. 2.3.1. Заряженные или полярные аминокислоты вообще говоря могут находиться внутри бислоя, однако на это налагаются определенные ограничения (разд. 3.6.2).

Рассмотрим три уровня амфифильных структур в мембранных белках: первичную, вторичную и третичную амфифильность.

1. *Первичные амфифильные структуры* содержат протяженный участок из преимущественно неполярных аминокислотных остатков, длина которого достаточна для пересечения бислоя. Такие структуры выявлены как в реакционном центре, так и в бактериородопсине. У этих белков все пронизывающие мембрану элементы являются α -спиральными. α -Спиральная структура предпочтительна потому, что при этом образуются все водородные связи, в которых могут участвовать атомы водорода полипептидного каркаса. Альтернативная структура, у которой отсутствует одна из водородных связей, менее стабильна примерно на 5 ккал/моль. Все это позволяет высказать предположение [389] о том, что поворот полипептидной цепи внутри мембраны маловероятен (см. работу [826] в качестве примера такой модели). В местах поворота от трех до пяти аминокислотных остатков не смогли бы образовать водородные связи, и это дестаби-

лизировало бы структуру примерно на 15—20 ккал/моль. В глобулярных, водорастворимых белках области поворота располагаются преимущественно на поверхности белковой глобулы, где амидные группы могут образовывать водородные связи с водой; по-видимому, в молекулах мембранных белков повороты также будут происходить лишь в экспонированных в воду участках [1129].

Не исключено, что β -слой тоже может образовывать трансмембранные элементы, имеющие, например, форму β -цилиндров, как в случае порина (разд. 3.5.3 и рис. 8.7). Требования, предъявляемые к образованию водородных связей атомами водорода полипептидного остова в подобных структурах, могут быть удовлетворены, но лишь при условии взаимодействия между отдельными β -цепями. Как такая структура может встраиваться в мембрану, не совсем ясно, а ограничения, налагаемые механизмами сборки мембранных белков, вообще неизвестны (см. разд. 10.3).

2. *Вторичные амфифильные структуры.* В таких структурах гидрофобные остатки периодически встречаются вдоль цепи, и при укладке полипептида в определенную вторичную структуру они образуют сплошную поверхность. Периодичность некоторых элементов вторичной структуры указана в табл. 3.7. В качестве примера белков, в которых вторичные амфифильные структуры, по-видимому, играют важную роль, можно привести порины. В них полярные и неполярные аминокислотные остатки в каждой из β -цепей чередуются (рис. 8.7). Все полярные остатки находятся на одной стороне складчатого слоя, выстилаая наполненную водой пору. Заметим, что все сказанное о порине носит гипотетический характер.

Таблица 3.7. Параметры вторичной структуры ¹⁾

Структура	Периодичность или число остатков на виток	Расстояние между остатками, Å	Радиус или ширина, Å
Неизогнутая β -цепь	2,0	3,2—3,4	0,9—1,1
Изогнутая β -цепь	2,3	3,3	1,0
3_{10} -Спираль	3,0	2,0	1,9
α -Спираль	3,6	1,5	2,3

¹⁾ Из работы [1305].

α -Спираль, в которой гидрофобные остатки встречаются через каждую вторую или третью мономерную единицу, должна иметь гидрофобную и полярную поверхности. Подобные структуры часто представляют в виде спирального кольца с указанием боковых цепей — так, как это сделано на рис. 3.9 [1294]. Вторичные амфифильные структуры могут возникать в ситуациях, схематически показанных на рис. 3.10.

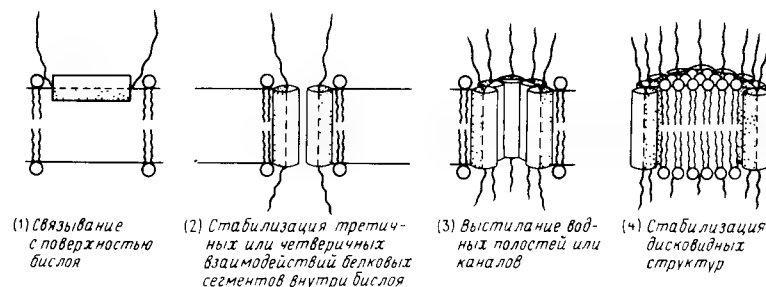


Рис. 3.10. Структурная роль некоторых вторичных амфифильных спиралей, взаимодействующих с липидным бислоем.

а. Поверхностно-активные сегменты белка; одна сторона спирали взаимодействует с гидрофобной областью липидного бислоя, а другая (полярная) контактирует с водной фазой и полярной областью бислоя. Амфифильные α -спирали способны образовывать многие пептидные гормоны, а также разрушающие мембрану пептиды, например меллитин (разд. 3.7).

б. Трансмембранные элементы; неполярная поверхность спирали обращена к липидной фазе, а полярная выстилает водный канал, пронизывающий бислой. Это весьма распространенная модель, построенная главным образом исходя из результатов исследования никотинового ацетилхолинового рецептора, функционирующего как химически возбудимый канал (см. разд. 8.2.4). Однако основанные на экспериментальных данных выводы о том, что мембрану пронизывает именно амфифильная спираль [258, 1623], вызвали возражения [776, 1198]. Такой наполненный водой канал, как в порине, может образовывать и амфифильная β -цепь (рис. 8.7).

в. Трансмембранные элементы; неполярная часть поверхности контактирует с липидами, а полярные группы — с полярными группами других трансмембранных элементов. Именно этот принцип лежит в основе «вывернутых» структур, каким предположительно является бактериородопсин [386]. Полярные взаимодействия между амфифильными спиралями в принципе могли бы стабилизировать взаимодействия между субъединицами в олигомерных белках.

3. Третичные амфифильные структуры. Об их существовании можно говорить только предположительно. Их гидрофобная поверхность должна формироваться на уровне третичной структуры остатков, расположенных в самых разных участках полипептидной цепи. Подобные структуры могут быть характерны для белков, связывающихся с бислоем, но не имеющих четко выраженных гидрофобных доменов, определяемых по любому из указанных выше критериев. Возможным примером такого рода является α -лактальбумин [91].

3.6.2. ИОНИЗИРУЕМЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ В ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТАХ [389, 646]

Многие модели мембранных белков (например, бактериородопсина) предполагают, что в их трансмембранных сегментах находятся ионизируемые остатки (разд. 3.5.2). Эти остатки (Arg, Lys, His, Asp, Glu), вероятно, играют важную функциональную и/или структурную роль. В некоторых случаях эта роль однозначно установлена: 1) остатки лизина в бактериородопсине (рис. 3.8) и родопсине (рис. 4.1) образуют шиффовы основания с протетической группой ретиналя, что необходимо для светового возбуждения молекулы [179]; 2) остатки гистидина в полипептидах реакционного центра бактерий участвуют в связывании с фотосинтетическими пигментами (разд. 3.5.1); 3) заряженные остатки в лактозопермеазе из *E. coli* участвуют в осуществлении этим белком транспортных функций; возможно, эти остатки образуют сеть водородных связей внутри молекулы белка (разд. 8.3.2).

Перенос заряженных групп из воды в среду с низкой диэлектрической проницаемостью внутри мембраны энергетически очень невыгоден (25—40 ккал/моль) [645, 389], и эти группы необходимо каким-либо образом стабилизировать. Неоднократно предполагалось, что для стабилизации достаточно образования ионных пар, и этот принцип использовался при построении трехмерной модели бактериородопсина [386]. Однако расчеты [645] показали, что свободная энергия переноса ионной пары из воды в среду с низкой диэлектрической проницаемостью тоже весьма велика (10—15 ккал/моль). Для дальнейшей стабилизации необходимы дополнительные полярные взаимодействия, возможно, с участием других полярных групп (например, карбонильных [1552, 1553]) или с помощью водородных связей [804, 645] (как в ионных парах в глобулярных водорастворимых белках [1197]).

В принципе даже одиночная заряженная группа внутри мембраны может стабилизироваться через взаимодействия с полярными группами и при участии водородных связей, эффективно делокализуя заряд. Можно привести несколько примеров изолированных, десольватированных ионов, стабилизированных за счет взаимодейст-

вий в водорастворимых белках [1187]. Аналогичные принципы, по-видимому, действуют в случае заряженных остатков трансмембранных сегментов интегральных белков.

Однако представляется более вероятным, что ионизируемые аминокислоты нейтрализуются внутри мембраны за счет протонирования или депротонирования [389]. Свободная энергия нейтрализации заряженных аминокислот, по оценкам, составляет примерно 10—17 ккал/моль. В отсутствие специфических условий для полярных взаимодействий, стабилизирующих заряженный остаток в трансмембранном сегменте, он скорее всего будет нейтрализован.

3.6.3. ЗАРЯЖЕННЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В СЕГМЕНТАХ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ В ВОДНУЮ СРЕДУ [1529]

Как мы уже говорили, заряженные остатки распределены между двумя сторонами реакционного центра бактерий асимметрично (разд. 3.5.1; [982]). Такая асимметрия характерна и для некоторых других внутренних мембранных белков бактерий [1529]. Так, основные остатки Lys и Arg в четыре раза чаще встречаются в тех соединяющих трансмембранные элементы участках, которые расположены на внутренней стороне мембраны, а не на наружной. Для кислых остатков Asp и Glu подобная тенденция не выявляется. Возможно, эта асимметрия связана с механизмом сборки мембранного белка, но как именно — неясно. Более того, неизвестно, можно ли обобщить это наблюдение и имеет ли оно какую-либо предсказательную ценность.

3.6.4. ОСОБАЯ РОЛЬ ПРОЛИНА?

В глобулярных, водорастворимых белках остатки пролина редко находятся в серединной части α -спирали. По данным исследований 58 белков, содержащих 331 α -спираль, выявлено 30 таких случаев [1155]. В половине из них пролин располагался в местах повреждения спирали, а в остальных случаях находился в области искривления или нерегулярности структуры.

В то же время у бактериородопсина (рис. 3.8) пролиновые остатки расположены в средней части трех из семи трансмембранных спиралей, а у родопсина (рис. 4.1) — в пяти из семи таких спиралей. Подобная тенденция выявлена и для других трансмембранных сегментов интегральных белков, особенно транспортных [315, 133]. Значение этого феномена неизвестно. Следует отметить, однако, что из-за наличия циклической боковой цепи пролин не образует водородных связей с остатками, находящимися на предыдущем витке α -спирали. Это может способствовать формированию структур,

в которых водородная связь образуется за счет специфического взаимодействия с остатком, расположенным в другом пронизывающем мембрану участке. Подобное полярное взаимодействие внутри бислоя могло бы стабилизировать трехмерную структуру мембранных белков.

3.6.5. СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПЕРВИЧНЫХ АМФИФИЛЬНЫХ СТРУКТУР

Однозначная структурная информация о мембранных белках получена лишь в нескольких случаях, но зато в распоряжении исследователей имеются обширные данные об аминокислотной последовательности, основанные на результатах секвенирования ДНК. Для идентификации трансмембранных α -спиралей, предположительно имеющих длину ~20 остатков и состоящих преимущественно из гидрофобных аминокислот, разработано несколько методов анализа аминокислотной последовательности [389]. В основе каждого из них лежит расположение аминокислот в ряд в соответствии с неким параметром, который отражает вероятность обнаружения этого остатка в трансмембранном сегменте.

Существует два типа шкал. В одном случае аминокислоты классифицируют по их относительной полярности или «гидрофобности». Эти шкалы имеют термодинамическую природу и основаны на величине изменения свободной энергии при переносе аминокислоты из водного раствора в углеводородную среду. Однако число способов количественной оценки гидрофобности аминокислот весьма велико, и они не во всем согласуются между собой [372, 389]. Часто используются данные, относящиеся одновременно к более чем одной физической характеристике [47, 804]. Примером такого рода является шкала «гидропатии» Кайта и Дулиттла [804], основанная на данных о гидрофобности, измеряемой по потенциалу гидратации [1602], а также о вероятности нахождения остатков внутри глобулы [217].

Шкала Голдмана, Энгелмана и Стейца [389] основана на количественной оценке свободной энергии переноса α -спиралей из водной среды внутрь мембраны. На рис. 3.11 сравнивается шкала Кайта—Дулиттла (КД) со шкалой Голдмана—Энгелмана—Стейца (ГЭС).

По оценке Энгелмана и др. [389], изменение свободной энергии при внедрении в мембрану полианионной α -спирали длиной 20 остатков составляет 30 ккал/моль. Расчет основан на оценке площади поверхности спирали, экспонированной в растворитель (см. аналогичный расчет для углеводородных цепей; рис. 2.16). Вклад в энергию каждой боковой группы оценивали с учетом площади поверхности, экспонированной в водную среду внутри спирали. Учитывали также свободную энергию переноса в бислой полярных групп. Например, предполагали, что глутамин при переносе в бислой будет протониро-

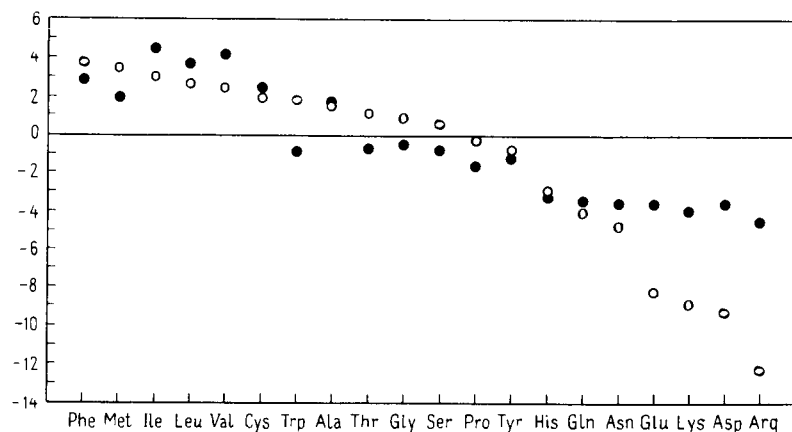


Рис. 3.11. Сравнение двух шкал, используемых для выявления трансмембранных спиралей: шкалы Кайта—Дулиттла (КД) (темные кружки) и шкалы Голдмана—Энгелмана—Стейца (светлые кружки). (Из работы [389].)

ваться и свободная энергия этого процесса составит 10,8 ккал/моль. Подобно этому, перенос гидроксильных (Ser, Thr) будет «стоять» примерно 4,0 ккал/моль.

Все сказанное выше показывает, как выигрыш в энергии взаимодействий при переносе α -спирали внутрь бислоя может использоваться для «втягивания» в бислой полярных боковых групп. Например, один остаток аргинина может встроиться в бислой в составе неполярной трансмембранной спирали, если он депротонирован; для этого требуется 16,7 ккал/моль при pH 7,0 (предполагается 99%-ное депротонирование). Суммарная свободная энергия переноса α -спирали по-прежнему останется отрицательной. Однако ситуация изменится, если в бислой понадобится встроить два аргининовых остатка (депротонированных) или если аргинин будет положительно заряжен. Конечно, полярные остатки могут стабилизироваться внутри бислоя благодаря специфическим взаимодействиям, но реально учесть это при расчетах очень трудно. Например, боковые группы серина, цистеина и треонина могут образовывать водородные связи с полипептидным остовом [541], а кислые и основные остатки могут образовывать ионные пары; появление таких пар возможно, если эти остатки расположены через четыре или пять мономерных единиц друг от друга [389].

Второй тип шкал, который используется для классификации аминокислот, основан на данных о частоте, с которой аминокислоты действительно встречаются в пронизывающих мембрану сегментах.

При этом эмпирически учитывается гидрофобность, а также многие другие факторы, которые нельзя оценить количественно, как гидрофобность. Недостаток этого полуэмпирического подхода состоит в отсутствии точных данных о границах трансмембранных участков. Тем не менее подобные шкалы могут быть столь же полезны, как и шкалы, основанные на термодинамических параметрах. В качестве примера можно привести шкалу «склонности» к мембране Куна и Лейгха [799] или шкалу «погруженности спирали в мембрану» Рао и Аргоса [1194]. Четыре наиболее гидрофобных остатка по шкале Голдмана—Энгелмана—Стейца (Phe, Met, Ile, Leu) являются также четырьмя остатками с наивысшим значением параметра по шкале Рао и Аргоса [1194].

На рис. 3.12 представлены профили трех разных мембранных белков, полученные с использованием различных шкал. При построении этих профилей учитываются средние значения чисел на шкалах, приписываемые каждой аминокислоте в пределах выбранного «окна»; это среднее откладывается относительно номера остатка в полипептиде. Например, если «окно» составляет 19 остатков, значение, приписанное положению 40, будет средним числом на шкале для всех аминокислот от 31 до 49 включительно. Значение, приписанное положению 41, будет средним для остатков с 32 по 50 и т. д. Пики на профиле соответствуют гидрофобным участкам или тем участкам, которые с большей вероятностью образуют трансмембранные спирали. Для построения профилей важен размер окна; большинство кривых на рис. 3.12 были построены при размере окна в 19 остатков.

Попробуем проинтерпретировать построенные профили. По шкале Голдмана—Энгелмана—Стейца пики при значениях, близких к нулю, соответствуют трансмембранным спиральям. Значение 1,25 по шкале Кайта—Дулиттла (рис. 3.12, А) является наименьшим значением, отвечающим известной трансмембранной спирали в L-субъединице реакционного центра *R. viridis*. Во всех трех случаях, представленных на рис. 3.12, профили для субъединиц реакционного центра сходны.

На рис. 3.12, Б приведены два профиля для цитохрома Р450 из микросом. Этот белок был выбран потому, что данные о его первичной структуре позволяют высказать предположение о наличии у него восьми трансмембранных спиралей. Однако имеющиеся экспериментальные данные указывают на существование только одного N-концевого якоря в мембране [306, 1274]. Как профиль Кайта—Дулиттла, так и профиль Голдмана—Энгелмана—Стейца выявляют N-концевой участок, но они указывают и на наличие одного или более дополнительных трансмембранных сегментов, что не соответствует действительности. Отметим, что многие из построенных моделей мембранных белков, которые основываются лишь на данных об аминокислотной последовательности, могут быть некорректными.

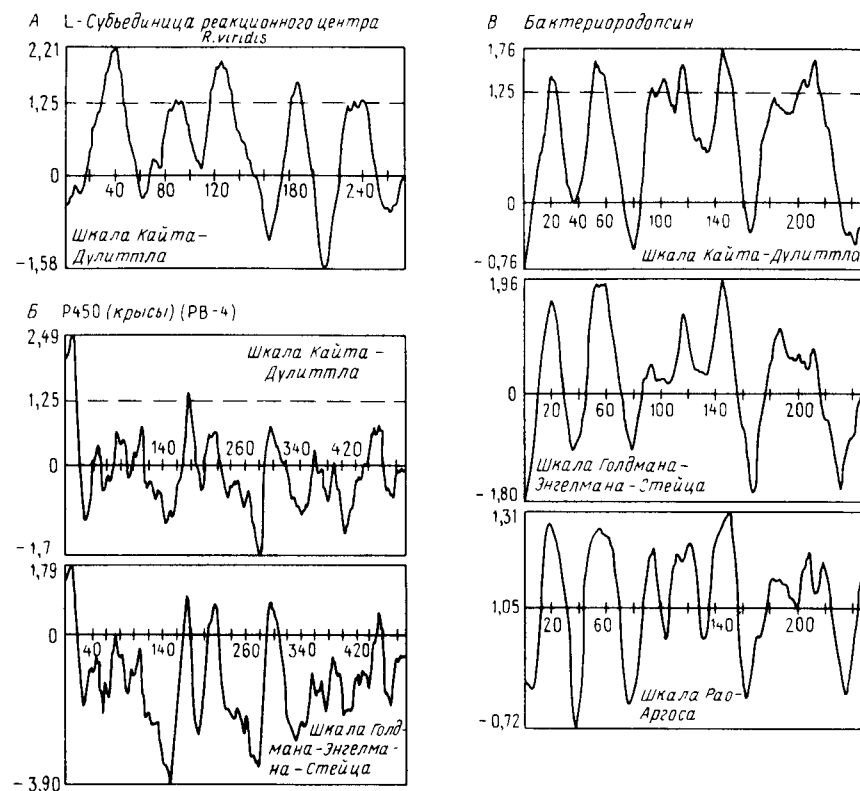


Рис. 3.12. Профили трех мембранных белков, позволяющие выявить трансмембранные спирали. Использованы шкалы Кайта—Дулиттла [804], Голдмана—Энгелмана—Стейца (ГЭС) [389] и Рао—Аргоса [1194]. Для построения профилей использовался пакет программ (SEQANAL), предоставленный д-ром А. Crofts (Иллинойский университет). Чтобы можно было проводить сравнения, графики Кайта—Дулиттла и ГЭС были построены при окне в 19 остатков, а затем сглажены с применением второго окна в 7 остатков. Среднее значение для каждого остатка отложено в зависимости от номера остатка, начиная с N-конца слева. В случае шкал Кайта—Дулиттла и ГЭС соответствующие значения представляют среднюю гидропатию и свободную энергию переноса на остаток (ккал/моль). При построении графика Рао—Аргоса применяли окно в 7 остатков, а затем проводили два сглаживания. Заметим, что использованный вариант алгоритма ГЭС не учитывает возможное образование ионных пар.

На рис. 3.12, В приведены три профиля для бактериородопсина. Несмотря на их сходство, видны различия в форме пиков, отвечающих семи трансмембранным сегментам. Алгоритм Голдмана—Энгелмана—Стейца не учитывает стабилизирующего эффекта, связанного с

образованием ионной пары из близко расположенных заряженных остатков в пределах одной спирали. С учетом этого фактора разделение между двумя последними спиралями (F и G) становится более четким [389].

Одна из проблем, с которыми сталкивается применение всех описанных выше алгоритмов, состоит в том, чтобы исключить гидрофобные сегменты в известных глобулярных белках, не являющиеся трансмембранными, но располагающиеся внутри белка. Однако, когда мы ищем достаточно протяженные участки, эта проблема не возникает [389, 1194].

Отметим, что алгоритмы, используемые для выявления α -спиральных структур в растворимых глобулярных белках, например алгоритм Чоу—Фасмана [218], непригодны для обнаружения трансмембранных элементов [1540]. Эти алгоритмы неприменимы для описания структуры неглобулярных участков, какими являются сегменты, расположенные внутри бислоя.

Алгоритмы, предназначенные для идентификации трансмембранных участков, нельзя использовать в случае сегментов, являющихся вторичными амфифильными структурами или пересекающих мембрану в виде β -слоя. В первом случае этот участок исключается из рассмотрения из-за наличия в нем полярных остатков, а во втором трансмембранный сегмент оказывается слишком коротким, поскольку для пересечения бислоя необходимо лишь 10—12 аминокислотных остатков в составе β -структуры. Некоторые алгоритмы предназначались скорее для выявления β -поворотов, а не самих трансмембранных элементов [826, 1129]. Хотя это позволяет избежать некоторых проблем, связанных с выделением различных классов трансмембранных элементов, неясно, насколько приемлемыми они окажутся при более широком их применении.

3.6.6. СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВТОРИЧНЫХ АМФИФИЛЬНЫХ СТРУКТУР

Разработано несколько подходов к выявлению вторичной амфифильности или асимметрии в распределении гидрофобных остатков в сегментах полипептидной цепи. Достаточно часто α -спирали и β -слои в глобулярных белках характеризуются периодичностью в распределении гидрофобных остатков [245]. Использование спирального кольца (см. рис. 3.9, А) как качественного показателя не всегда оправданно [441], необходимы более количественные подходы. Основной из них — это определение периодичности в распределении гидрофобных остатков с помощью методов фурье-преобразования. В качестве примера можно привести гидрофобный момент.

1. *Гидрофобный момент.* Этот параметр был предложен Эйзенбергом и др. [372, 373, 375, 374]. Он определяется как

$$\mu_n = \left\{ \left[\sum_{n=1}^N H_n \sin(\delta n) \right]^2 + \left[\sum_{n=1}^N H_n \cos(\delta n) \right]^2 \right\}^{1/2} \quad (3.4)$$

и представляет собой некую векторную сумму гидрофобности остатков в сегменте из N элементов. Гидрофобность каждого остатка (H_n) представлена в виде вектора, который характеризуется углом ($n\delta$), образуемым боковой цепью и осью полипептидного остова. Для α -спирали $\delta = 100^\circ$. На рис. 3.9, Б «векторы» гидрофобности представлены в проекции на плоскость спирального кольца, и гидрофобный момент равен их векторной сумме. Гидрофильный остаток представляется вектором с отрицательной направленностью. Для случайной последовательности значение μ_n в силу случайного распределения гидрофобных остатков будет очень мало. В то же время в пептиде меллитине (рис. 3.9, Б) гидрофобные остатки расположены с одной стороны структуры, а полярные — с другой (разд. 3.7.1). Численное значение гидрофобного момента приписывается аминокислоте, находящейся в центре анализируемого сегмента. Следовательно, можно «просканировать» последовательность и приписать каждому положению среднюю гидрофобность, а также найти μ_n .

Эйзенберг и др. проанализировали сегменты длиной 11 остатков из многих белков и пептидов [373], определив гидрофобный момент μ_n и среднюю гидрофобность $\langle H \rangle$ для каждого из исследуемых сегментов. Для полипептидных сегментов глобулярных белков характерны низкие значения как $\langle H \rangle$, так и μ_n . Трансмембранные элементы гидрофобного характера имеют высокие значения $\langle H \rangle$, но низкие значения μ_n , являясь в основном неполярными. Пептиды и участки белков, относящиеся к «поверхностно-активным», имеют высокие значения μ_n из-за сильной асимметрии в распределении полярных и неполярных остатков. С помощью этого алгоритма были идентифицированы некоторые сегменты поверхностно-активных белков, например участки дифтерийного токсина [373] и пируватоксидазы из *E. coli* [1206].

Гидрофобный момент служит количественной мерой периодичности в распределении гидрофобных остатков в разных участках полипептида. Важную роль при этом играет выбор δ . Гидрофобный момент является по существу одним из параметров фурье-преобразования функции гидрофобности. Более общие методы, описанные ниже, позволяют проанализировать все фурье-компоненты и выявить любую возможную периодичность.

2. *Периодичность последовательности.* Разработано много методов идентификации участков белковых молекул, для которых характерны периодические изменения гидрофобности вдоль цепи [374, 998, 429]. Все они включают фурье-преобразование функции, зависящей от гидрофобности аминокислотных остатков вдоль полипептида. Наличие пика с периодом 3,6 указывает на то, что гидрофобный

остаток в данном сегменте анализируемого полипептида встречается в среднем через каждые 3,6 остатка. Это означает, что сегмент является α -спиралью, на одной стороне которой находятся преимущественно гидрофобные остатки. Этот метод использовался для идентификации амфифильных участков в некоторых транспортных белках и белках, образующих каналы; в качестве примера можно привести ацетилхолиновый рецептор [429, 258], натриевый канал [780], переносчик глюкозы [1027], белок-разобщитель митохондрий [46] и белок полосы 3 эритроцитов, являющийся анионным переносчиком [774]. Однако четкие указания на то, что эти предполагаемые амфифильные спирали являются трансмембранными, отсутствуют (см. разд. 8.2.4).

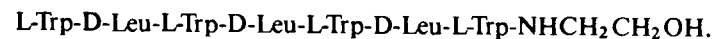
Эти методы использовались также для анализа пептидов, взаимодействующих с мембранной поверхностью [372], и аполипопroteinов [784, 1172].

3.7. Пептиды — модели мембранных белков

Пептиды стали использоваться для изучения белково-липидных взаимодействий много лет назад. В большинстве случаев это были природные мембраноактивные пептиды, в первую очередь грамицидин А, аламетицин и меллитин. В настоящее время в качестве модельных систем чаще применяют синтетические пептиды. При этом необходимо помнить о двух моментах: 1) при связывании пептида с мембраной существенны как первичная, так и вторичная амфифильности; 2) пептиды часто обладают полиморфизмом, т. е. способностью изменять конформацию в зависимости от окружения. Не исключено, что в будущем с помощью синтетических пептидов удастся детально изучить белково-липидные взаимодействия, но пока мы еще очень далеки от этого.

3.7.1. ПРИРОДНЫЕ ПЕПТИДЫ

1. *Грамицидин А* — это гидрофобный пептид, состоящий из 15 L- и D-аминокислот. Он имеет следующую аминокислотную последовательность [1282]:



При встраивании в мембрану грамицидин А образует каналы, пропускающие одновалентные катионы ([430]; разд. 8.1.5). Многочисленные исследования с использованием плоских мембран и липосом показали, что канал представляет собой пептидный димер. Было предложено много моделей грамицидинового канала, но адекватной

[1564], по-видимому, является модель, впервые предложенная Урри [1484]. Согласно этой модели (рис. 3.13), грамицидин А находится в форме β (L, D)-спирали [ранее ее называли π (L, D)-спиралью], в которой два мономера нековалентно связаны своими N-концами в середине бислоя. Общая длина канала составляет около 30 Å, а наружный и внутренний диаметры равны соответственно 15 и 5 Å. Все гидрофобные боковые группы находятся снаружи спирали, а гидрофильные карбонильные группы пептидного остова выстилают пору. Из органического растворителя были получены кристаллы грамицидина, чья структура была определена с разрешением 2,5 Å методом рентгеновской дифракции [1537]. Однако эта структура, по всей вероятности, отличается от той, которую имеет грамицидин А в мембране.

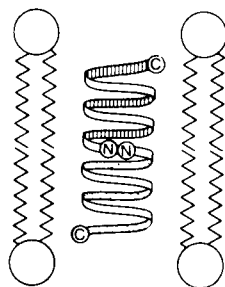


Рис. 3.13. Схематическое представление канала, образуемого димером грамицидина А в бислое. (Из работы [1564].)

Поскольку в состав грамицидина входят необычные D-аминокислоты, его нельзя использовать в качестве модели структур, встречающихся в мембранных белках. Однако этот пептид все же позволяет получить представление об одном из способов образования селективной поры в бислое (см. гл. 8). Грамицидин А — легкодоступный белок, поэтому его часто использовали также в качестве «модельного мембранного белка» при исследовании возмущающего действия мембранных белков на липиды [831]. При достаточно высокой концентрации в мембране (> 5 мол. %) грамицидин А агрегирует с образованием тубулярных структур и индуцирует образование гексагональной фазы Н_{II} в модельных мембранах [137].

2. **Аламетицин** — это пептидный антибиотик из 20 аминокислотных остатков, способный образовывать в мембране электровозбудимые каналы ([1030]; разд. 8.1.5). Аминокислотная последовательность аламетицина приведена ниже и включает необычные остатки — α -аминомасляную кислоту (Aib) и L-фенилаланин (Phl):

Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-

-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Glu-Phl.

Данные по независимости проводимости аламетициновых каналов в плоских мембранах от концентрации пептида свидетельствуют о том, что каждый канал образован 6—11 молекулами. Согласно результатам рентгеноструктурного анализа (структура аламетицина была определена с разрешением 1,5 Å [456]), пептид является в основном α -спиралью с изгибом в середине, на уровне пролина-14. Эта структура содержит цепочку доступных для растворителя полярных атомов, тянущуюся вдоль всей молекулы, что придает ей амфифильный характер. В этой цепочке представлены карбонильные группы остова, подобные полярным группам, образующим полость грамицидинового канала. Фокс и Ричардс [456] построили модель аламетицинового канала, основанную на этой молекулярной конфигурации, оптимизировав взаимодействия между отдельными цепочками и параметры упаковки. Согласно этой модели (рис. 3.14), каждый канал образован олигомерным (~ 8) кластером молекул, соединенных водородными связями с образованием стабильной структуры, в которой полярные атомы экспонированы в растворитель. Предполагается, что конформационное изменение в этой структуре происходит при возникновении напряжения поперек бислоя, которое стабилизирует «открытую» конформацию канала и обеспечивает электровозбудимое проведение. Длина канала, согласно модели, составляет 32 Å, что достаточно для пересечения неполярной части бислоя.

3. **Мелиттин** (компонент пчелиного яда) [372, 721] в отличие от грамицидина А или аламетицина является водорастворимым пептидом. Он состоит из 20 аминокислот, многие из которых полярны [566]:

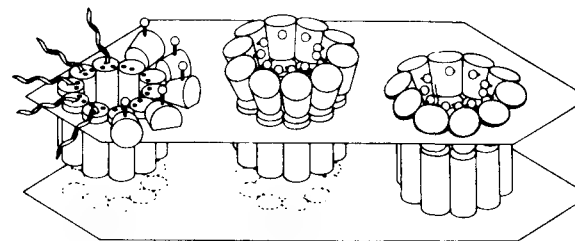
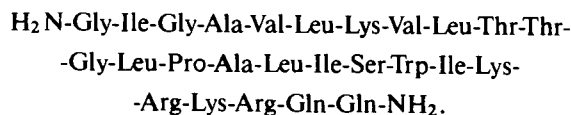


Рис. 3.14. Предполагаемые структуры, образуемые аламетициновыми олигомерами в липидном бислое. Показаны три конформации: конформация в отсутствие наложенного трансмембранного потенциала (слева), конформация открытого канала при наличии потенциала (справа) и промежуточная конформация (в центре) (см. также разд. 8.1.5, где обсуждаются каналообразующие свойства этого пептида). (Из работы [456].) Любезно предоставлено д-ром F. Richards.



Мелиттин встраивается в клеточные мембраны, вызывая лизис клеток; он также может образовывать электровозбудимые каналы в плоских мембранах [740]. Мелиттин является «поверхностно-активным» пептидом, который образует монослой на границе раздела воздух—вода. Структура мелиттина была установлена методом рентгеновской кристаллографии. Он существует в двух кристаллических формах [1445]. В обоих случаях это изогнутые α -спирали, аналогичные аламетициновой спирали. Структура обладает ярко выраженной амфифильностью (рис. 3.15) из-за асимметричного распределения полярных боковых цепей. Грамицидин А и аламетицин также амфифильны, но полярные группы в значительной степени представлены карбонильными группами остова, а не полярными боковыми цепями. Мелиттин, подобно другим пептидам, полиморфен. В водном растворе он существует в виде мономера, в котором, по данным КД, только 7% аминокислотных остатков входят в состав α -спиралей. В водном растворе мелиттин может также образовывать тетрамеры и связываться с мембранами. В двух последних случаях степень спиральности достигает $\sim 70\%$ [1522]. Способ связывания мелиттина с мембранами и механизм(ы), с помощью которого он разрушает бислой, недостаточно изучены [1445, 302, 353]. Согласно одной из моделей [1445], разрушение происходит в соответствии с эффектом «клина» [299]: мелиттин связывается с одной стороной бислоя и дестабилизирует ее, повышая площадь поверхности так, как это делают детергенты [614]. Мелиттин может также образовывать электровозбудимые каналы в плоских мембранах [164]. По всей вероятности, способы связывания его с бислоем весьма разнообразны и зависят от экспериментальных условий [283, 353].

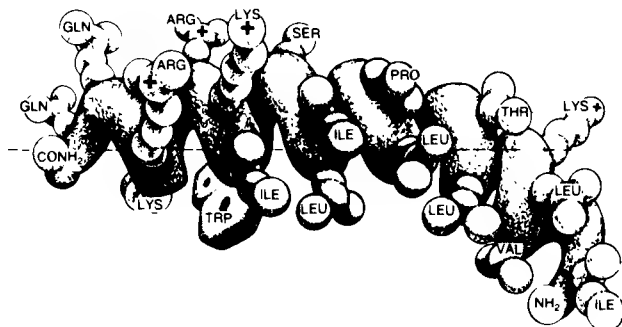


Рис. 3.15. Предполагаемая структура мелиттина, связанного с поверхностью фосфатидилхолинового бислоя. Гидрофобные остатки расположены на нижней поверхности и заряжены, гидрофильные — на верхней. (Из работы [1445].) Любезно предоставлено д-ром D. Eisenberg.

4. *Пептидные гормоны* часто содержат потенциально амфифильные α -спиральные участки, аналогичные соответствующим участкам в мелиттине [721]. Примерами могут служить β -эндорфин [107], кальцитонин [392], кортикотропин [1506], рилизинг-фактор кортикотропина [821]. Высказывалось предположение, что эти гормоны связываются с мембраной с помощью амфифильных спиралей; при этом вторичная структура пептида, стабилизируемая мембраной, облегчает связывание гормона со специфическим рецептором. Все они являются водорастворимыми пептидами, но обладают сродством к фосфолипидным бислоям. α -Спиральные участки могут располагаться на N-конце (кортикотропин), на C-конце (β -эндорфин) или в средней части молекулы (рилизинг-фактор кортикотропина). Было показано, что биологическая активность β -эндорфина обусловлена именно амфифильностью, а не аминокислотным составом спирального участка [107]. Подобные структуры демонстрируют нам один из способов, которыми белковые молекулы могут связываться с мембраной (например, пируватоксидаза) [1206].

3.7.2. МОДЕЛЬНЫЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ [721]

Синтетические пептиды можно разделить на два класса: 1) пептиды, которые проявляют первичную амфифильность и могут служить моделью трансмембранной гидрофобной α -спирали; 2) пептиды, обладающие потенциальной вторичной амфифильностью и имеющие форму α -спирали или β -слоя.

1. *Первичные амфифильные пептиды.* Проводились исследования [1021], в которых амфифильные пептиды, например Gly-Leu-Lys₂-Ala-амид, исследовали в комплексах с синтетическими фосфолипидами с помощью ЯМР и дифференциальной сканирующей калориметрии. С помощью фазовой диаграммы «температура/состав» для пептидно-липидной смеси проверяли адекватность термодинамических моделей этой бинарной системы. Были сделаны следующие выводы: 1) для объяснения термодинамических свойств пептидов не требуется делать допущение о существовании липидного кольца, связанного с пептидом и изолированного от остальных липидов; 2) неправильные оценки толщины гидрофобного участка липидного бислоя и длины предполагаемого α -спирального пептида не сказываются существенным образом на фазовом поведении системы.

2. *Вторичные амфифильные пептиды.* Пептидам, способным образовывать амфифильные α -спирали, посвящено множество работ. Моделировались потенциальные α -спиральные участки пептидных гормонов (например, β -эндорфина [107]), кальцитонина [1001, 392], мелиттина [302] и аполипопротеинов. Липопротеины — это глобулярные белково-липидные комплексы, присутствующие в сыворотке. Аполипопротеины, выделенные из таких комплексов и принадлежа-

щие к классам А, С и Е, содержат потенциально амфифильные α -спиральные участки, которые, по всей вероятности, и взаимодействуют с липидами. Некоторые пептиды, синтезированные специально для моделирования амфифильных элементов аполипопротеинов, обладают замечательными свойствами [214, 33, 470]. Они способны стабилизировать бислойные диски (диаметром ~ 100 Å), связываясь, как полагают, по их краю. Эти дисковидные комплексы напоминают структуры, образуемые аполипопротеиновыми комплексами с фосфолипидами. Другие амфифильные пептиды, например мелиттин [1328, 353] и глюкагон [393], по всей вероятности, также стабилизируют дисковидные частицы или плоские слои липидного бислоя. Следует отметить, что разные амфифильные пептиды существенно различаются по характеру взаимодействия с фосфолипидами (они могут связываться с поверхностью, стабилизировать дисковидные комплексы, образовывать трансбислойные каналы, разрушать бислой подобно детергентам). Причина такого разнообразия не установлена.

Были синтезированы также пептиды, образующие амфифильные β -слои, которые служили моделью поверхностно-активных белков [1103]. Необходимо подчеркнуть, что структура некоторых пептидов в водном растворе может существенно отличаться от структуры, предсказываемой на основании алгоритма Чоу—Фасмана [218], который разрабатывался применительно к глобулярным белкам.

3.8. Мембранные белки, ковалентно связанные с липидами [1322, 260, 875]

Многие мембранные белки эукариот и прокариот ковалентно связаны с липидами, которые присоединяются к полипептиду после трансляции (табл. 3.8). В некоторых случаях эти липиды играют роль гидрофобного «якоря», с помощью которого белок прикрепляется к мембране. В других случаях роль липидов менее очевидна; возможно, они участвуют в процессе миграции белка в соответствующую область клетки или (как в случае белков оболочки вирусов) в слиянии мембран.

В качестве примера наиболее полно охарактеризованного белка прокариот можно привести липопротейн Брауна [591] — основной липопротейн наружной мембраны *E. coli*. Зрелая форма этого белка содержит ацилглицерол, связанный тиоэфирной связью с N-концевым цистеином. Кроме того, N-концевая аминокислота связана с жирной кислотой амидной связью. Мембраносвязанная форма пенициллиназы из *Bacillus licheniformis* прикрепляется к цитоплазматической мембране с помощью N-концевого ацилглицерола аналогично липопротейнам наружной мембраны [811].

Таблица 3.8. Некоторые мембранные белки, ковалентно связанные с липидами

1. Прокариоты	
1.	Липопротейны наружной мембраны бактерий <i>E. coli</i> [591]
2.	Пенициллиназа (<i>B. licheniformis</i>) [811]
3.	Цитохромная субъединица реакционного центра [1569]
II. Эукариоты	
(А)	Белки, к которым присоединена миристиновая кислота [1322]
1.	p60 ^{src}
2.	Каталитическая субъединица сАМР-протеинкиназы
3.	НАРН-цитохром <i>b₅</i> —редуктаза
4.	α -Субъединица гуаниннуклеотидсвязывающего белка [172]
(Б)	Белки, к которым присоединена пальмитиновая кислота [1322]
1.	p21 ^{ras}
2.	Гликопротеин G вируса везикулярного стоматита
3.	НА-Гликопротеин вируса гриппа
4.	Трансферриновый рецептор (млекопитающие)
5.	Родопсин
6.	Анкирин
(В)	Белки с гликозилфосфатидилинозитольным якорем [1322, 260, 875]
1.	Гликопротеин Thy-1
2.	Поверхностный гликопротеин трипаносом
3.	Ацетилхолинэстераза
4.	5'-Нуклеотидаза
5.	Щелочная фосфатаза
6.	Адгезивная молекула нервных клеток (N-CAM) [120]

Мембранные белки эукариот часто бывают ковалентно связаны с липидами. Их можно разделить на три класса: 1) белки, связанные с миристиновой кислотой; 2) белки, связанные с пальмитиновой кислотой; 3) белки, связанные с гликозилфосфатидилинозитолом. Белки, связанные с жирными кислотами, по-видимому, локализованы в основном на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны [1583], а белки, связанные с фосфатидилинозитолом, — на наружной [184, 418].

Миристиновая кислота присоединяется к белку через амидную связь с N-концевым глицином, причем, вероятно, это происходит одновременно с трансляцией на рибосомах. Не все миристинированные белки связаны с плазматической мембраной [1583]. Пальмитиновая кислота чаще всего присоединяется к белкам путем образования тиоэфирной связи с цистеином или гидроксиэфирной связи с серином и треонином. Эти аминокислотные остатки обычно расположены внутри основной части полипептида вблизи трансмембранных участков, как правило, на цитоплазматической стороне. Присоединение пальмитиновой кислоты происходит посттрансляционно.

Небольшой класс эукариотических белков плазматической мем-

браны присоединяется к наружной поверхности клетки с помощью ковалентно связанного гликофосфолипида — производного фосфатидилинозитола. Эта связь всегда локализована на С-конце аминокислоты. Фосфолипидный якорь присоединяется посттрансляционно после протеолитического отщепления аминокислот 17—31 от карбоксильного конца молекулы-предшественника. Этот якорь в некоторых случаях является единственным способом прикрепления белка к мембране, поскольку в присутствии фосфолипазы С происходит отсоединение белка от мембраны. Почему эта небольшая группа белков прикрепляется к плазматической мембране именно таким способом — неизвестно.

3.9. Мембранные белки, ковалентно связанные с углеводами [1245, 634]

Поверхностные белки клеток млекопитающих, в том числе большинство рецепторов и транспортных белков, почти всегда гликозилированы (гл. 8 и 9). Почему это так — неясно. Возможно, это связано с необходимостью сортировки белков при направлении их к плазматической мембране (см. гл. 10). Сахарные остатки могут защищать белок от протеолиза или участвовать в узнавании или адгезии (см. разд. 9.3). Как бы то ни было, ясно, что сахарные остатки в мембранных гликопротеинах локализованы исключительно на наружной стороне мембраны. Имеются также гликопротеины, локализованные в цитозоли [643].

Можно выделить два основных класса олигосахаридных структур мембранных гликопротеинов: 1) N-гликозидные олигосахариды, связанные с белками через амидную группу аспарагина; 2) O-гликозидные олигосахариды, связанные через гидроксильные группы серина или треонина (рис. 3.16). Более полно изучен процесс образования N-гликозидных связей (см. гл. 10; [1245, 634]). Этот класс олигосахаридов состоит из трех подклассов.

1. Простой или обогащенный маннозой комплекс, в котором олигосахарид содержит маннозу и N-ацетилглюкозамин в гептасахаридном коре (рис. 3.16).

2. Нормальный комплекс, в котором обогащенный маннозой кор имеет дополнительные боковые ветви, содержащие другие сахаридные остатки, например сиаловую кислоту.

3. Большой комплекс, в котором содержится длинный полимер с повторами Gal β 1-4GlcNAc. Такой комплекс связан с белком полосы 3 — анионным переносчиком мембраны эритроцитов (см. разд. 8.3.3).

Большинство олигосахаридов мембранных гликопротеинов принадлежат к подклассу 1 или 2. Олигосахариды, принадлежащие дан-

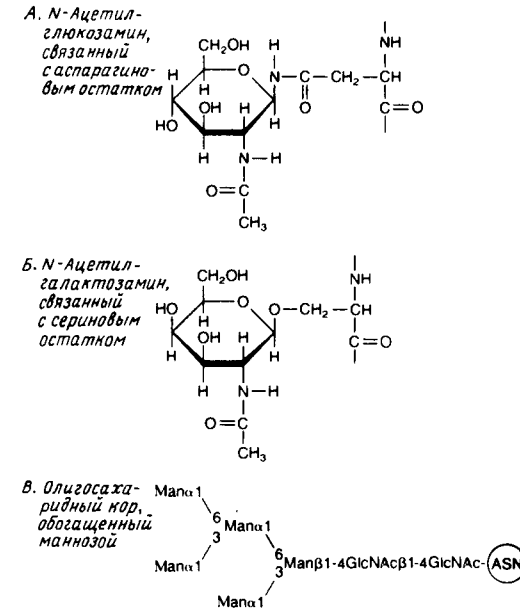


Рис. 3.16. Гликозидные связи, обычно обнаруживаемые в мембранных гликопротеинах. А. N-Гликозидная связь. Б. O-Гликозидная связь. В. Олигосахаридный кор, обогащенный маннозой.

ному подклассу, обладают выраженным структурным сходством, поэтому вряд ли сахарные остатки каждого гликопротеина выполняют какие-то специфические функции.

На рис. 3.17 приведена структура типичного гликопротеина — гликофорина А из мембраны эритроцитов. Этот полипептид имеет единственный гидрофобный трансмембранный участок и гликозилирован путем присоединения единственного N-гликозидного олигосахарида и 15 серин/треонин-связанных олигосахаридов. Все они расположены на N-концевой половине полипептида, которая является вицитоплазматической.

3.10. Резюме

Мембранные белки связываются с мембранами разными способами. Ассоциация некоторых периферических мембранных белков с поверхностью мембраны осуществляется при помощи электростатических и гидрофобных нековалентных взаимодействий. В других случа-

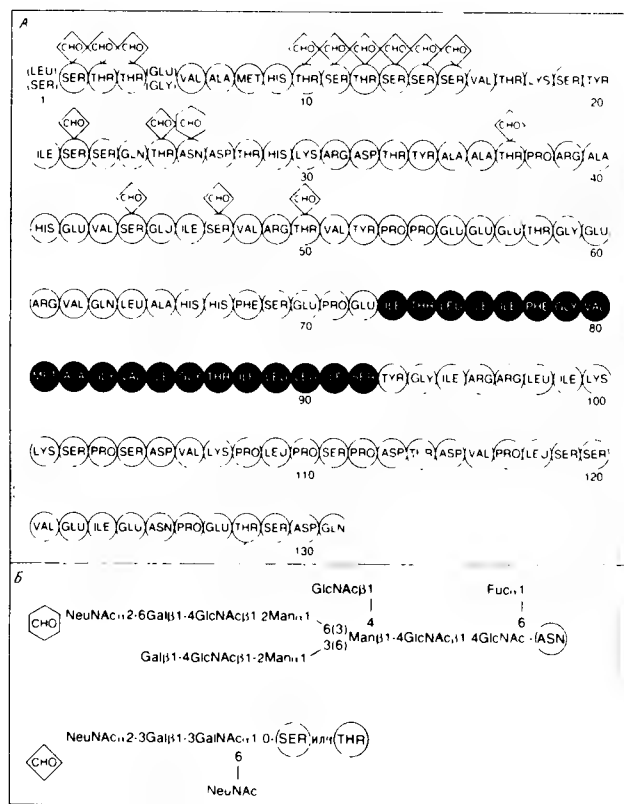


Рис. 3.17. А. Первичная структура гликофорина А из эритроцитов человека. Черные кружки — гидрофобный трансмембранный участок полипептида. Указаны места ковалентного присоединения углеводов (CHO), а также представлены различия в последовательностях М- (вверху) и N- (внизу) вариантов гликофорина А. (Данные предоставлены д-ром Н. Furthmays и взяты из работ [1460] и [475].) Б. Предполагаемая структура N-связанного (вверху) и O-связанного (внизу) олигосахаридов, присоединенных к гликофору А. (Из работ [475, 1460 и 469].)

ях белки прикрепляются к мембране с помощью ковалентно связанных с ними липидов. Многие мембранные белки содержат неполярные домены, внедряющиеся в гидрофобную сердцевину бислоя. Исследования фотосинтетических реакционных центров бактерий и бактериородопсина свидетельствуют о том, что основным неполярным элементом является трансмембранный α -спираль. Исходя из данных об аминокислотной последовательности, были построены модели интегральных мембранных белков, содержащие от 1 до 12

трансмембранных α -спиралей. Для идентификации сегментов, потенциально способных образовывать подобные спирали, используются специальные алгоритмы, однако применять такие подходы следует с осторожностью. Как показали исследования поринов из наружной мембраны грамотрицательных бактерий, эти белки, по-видимому, обладают трансмембранными β -структурами, имеющими форму β -цилиндра. Для более надежной интерпретации данных, получаемых с помощью алгоритмов для идентификации трансмембранных элементов, необходимы дополнительные экспериментальные данные по способам укладки мембранных белков.

С разработкой новых методов очистки мембранных белков, основанных на применении различных детергентов, а также с использованием методов секвенирования ДНК удастся получить новую информацию о структуре мембранных белков. Во многих случаях даже в отсутствие очищенного мембранного белка из данных по секвенированию ДНК можно определить его аминокислотную последовательность и с использованием алгоритмов для выявления трансмембранных участков построить модель укладки белка в бислой. По всей вероятности, таких моделей будет появляться все больше, и необходимо разрабатывать новые методы для их экспериментального подтверждения.

Данные по вторичной и четвертичной структуре очищенных мембранных белков можно получить с помощью биохимических и спектроскопических методов. Однако для построения моделей с высоким разрешением, необходимых для установления связи между структурой и функцией многих мембранных белков, следует применять рентгеноструктурный анализ. Показательным в этом отношении является успех, достигнутый при изучении реакционных центров бактерий.

АСИММЕТРИЯ МЕМБРАН

4.1. Введение

Все биологические мембраны асимметричны, и легко понять почему: ведь каждая из них имеет две поверхности, омываемые разными средами. В качестве примера можно привести плазматическую мембрану, обращенную одной стороной в цитоплазму, а другой — во внеклеточное пространство. Именно трансмембранная асимметрия, дифференцирующая две половинки бислоя, обуславливает чувствительность мембраны к изменениям среды по обе ее стороны. Очевидно, что асимметрия мембранных белков зависит от способа, каким тот или иной белок был внедрен в мембрану. Скорость «флип-флопа» белков в бислое пренебрежимо мала (под «флип-флопом» обычно понимают поворот молекулы на 180° вокруг оси, параллельной плоскости мембраны). Мембранные липиды тоже расположены асимметрично. Наиболее убедительно это было показано для эритроцитов. Как возникает липидная асимметрия и как она поддерживается — в настоящее время во многом неясно. В одних случаях важную роль играют физические факторы, в частности кривизна мембраны, в других определяющий вклад вносят взаимодействия с цитоскелетом или участие АТФ-зависимых ферментоподобных «флипаз».

Ясно, что помимо трансмембранной асимметрии мембранам присуща и латеральная негомогенность. Поверхностная мембрана многих эукариотических клеток сильно поляризована и имеет четко выраженные макроскопические домены. В качестве примера можно привести базолатеральную и апикальную области плазматической мембраны поляризованных эпителиальных клеток (см. рис. 1.2). Эти домены выполняют различные функции, имеют неодинаковый состав и физически разнесены по поверхности клетки. Мембраны тилакоидов в хлоропластах также имеют доменную структуру; в частности, у них есть плотно прилегающие друг к другу мембранные участки и несоприкасающиеся области, содержащие различные элементы системы электронного транспорта. Эти достаточно протяженные латеральные домены могут существовать за счет специфических белок-белковых взаимодействий между мембранами (как в случае ти-

лакоидов) или могут быть обусловлены наличием в самой мембране специальных структур (например, «плотных контактов»), взаимодействием с компонентами цитоскелета или агрегацией белков в плоскости мембраны. Детали этих взаимодействий пока неизвестны.

Что касается возможности существования малых липидных доменов в мембране, т. е. отдельных участков, в пределах которых бислой имеет специфические физические свойства и состав, то говорить об этом можно с меньшей определенностью. В модельных системах при различных условиях действительно наблюдается латеральное разделение фаз [607] (см. также рис. 2.25), и заманчиво было бы предположить, что подобное разделение существует и в биологических мембранах при физиологических условиях. Возможно, это небислойные элементы мембраны или какие-то переходные структуры.

В этой главе мы рассмотрим асимметричное распределение мембранных белков и липидов. В целом всю эту область можно назвать мембранной топографией. Сюда же относится и описание цитоскелета, поскольку он, по-видимому, играет важную роль в организации белков и, возможно, липидов в плазматической мембране эукариот. В гл. 5 будет рассмотрена динамика липидов и белков в мембранах, а в гл. 10 — механизм транспорта этих соединений между мембранами.

4.2. Топография мембранных белков

Мембранные белки встроены в бислой асимметрично (гл. 10), и эта асимметрия регулируется кинетическими факторами. Энергия активации для такой переориентации белка в мембране, когда полярные и заряженные остатки, обычно находящиеся на поверхности, хотя бы временно оказываются в гидрофобной области бислоя, очень велика. И хотя известно, что некоторые мембранные белки диффундируют вдоль бислоя и/или вращаются вокруг оси, перпендикулярной его поверхности (см. гл. 5), нет никаких данных о том, что какое-либо спонтанное перемещение может привести к изменению трансмембранной ориентации белка по отношению к двум сторонам бислоя.

В этом разделе представлен обзор основных экспериментальных подходов к определению трансмембранной ориентации белков в бислое. Как отмечалось в гл. 3, есть много способов, позволяющих предсказать локализацию спиралей, пронизывающих мембрану, исходя из первичной последовательности данного белка. В одних случаях эти предсказания являются достаточно четкими и согласуются с результатами экспериментальных исследований (как, например, для бактериородопсина; разд. 3.5.2), в других однозначный ответ получить не удастся (например, для ацетилхолинового рецептора; разд. 8.2.4). Ни одна модель, построенная с помощью компьютера,

не является окончательной, она дает лишь исходную точку для анализа. Совершенно ясно, что любое детальное исследование интегрального мембранного белка должно включать экспериментальное изучение его топографии. Сделать это бывает непросто, и часто для построения адекватной модели приходится применять несколько подходов, поскольку ни один метод не застрахован от ошибок. Детальному рассмотрению отдельных экспериментальных подходов посвящены обзоры [399, 593].

4.2.1. МЕТОДОЛОГИЯ

Протеолиз

Использование протеаз для определения топографии белков в ряде случаев оказалось исключительно плодотворным [593]. Ориентированный мембранный препарат (например, замкнутые везикулы с известной топологией мембраны), содержащий изучаемый белок, обрабатывают протеолитическим ферментом (трипсином или термолизином) и по местам расщепления устанавливают те участки полипептида, которые находятся с наружной стороны мембраны. Ключевым моментом является приготовление мембран с однозначной топологической ориентацией (например, мембран, у которых наружу обращена определенная сторона); только в этом случае возможна адекватная интерпретация результатов фрагментации изучаемого белка. Некоторые мембраны (например, мембраны эритроцитов или оболочки вирусов) можно изучать без предварительного выделения. Однако в большинстве случаев необходима тщательная работа по получению топологически ориентированного препарата с вывернутой мембраной или с мембраной, имеющей нативную ориентацию. Такие препараты были получены для мембран эритроцитов, плазматических мембран некоторых эукариотических клеток, внутренних митохондриальных мембран, мембран саркоплазматического ретикула и некоторых бактериальных мембран [1314, 853]. В отдельных случаях удается исследовать локализацию конкретного белка, специально встроенного в ориентированную мембрану реконструированных протеолипосом. В биологических мембранах помимо изучаемого белка чаще всего находятся и другие белки. Если изучаемый белок преобладает, то продукты протеолиза можно выделить и охарактеризовать. Если же он является минорным белковым компонентом, то для идентификации фрагментов приходится использовать косвенные методы, связанные с применением специфических антител или химических реагентов с последующим электрофорезом в ПААГ в присутствии ДСН. Важно убедиться в том, что те участки белка, которые недоступны для расщепления, не будут подвергаться гидролизу из-за повреждения мембран при первоначальном протеолизе

[1314]. Необходимо также быстро и обратимо ингибировать протеазы, поскольку многие из этих ферментов остаются активными даже после добавления ДСН перед электрофорезом. Следует иметь в виду, что отсутствие расщепления еще ничего не означает, поскольку возможные места расщепления на наружной поверхности могут оказаться недоступными для протеазы из-за особенностей третичной структуры мембранного белка.

Как и в случае многих растворимых белков, протеолиз не обязательно сопровождается существенными изменениями в третичной или четвертичной структуре мембранного белка *in situ*, хотя его биологическая функция может быть полностью утрачена. В тех случаях, когда при расщеплении по одному или двум местам активность исчезает, с помощью протеолиза можно идентифицировать и даже выделить функционально важные домены белка.

В качестве примеров, иллюстрирующих использование протеолитических ферментов, можно привести белок полосы 3 эритроцитов [707], бактериородопсин [853], лактозопермеазу *E. coli* [1314] и субъединицу IV цитохром с-оксидазы [913].

Иммунологические методы

Очень ценным инструментом для определения топографии мембранных белков являются специфичные антитела. В этом случае исследуют связывание антител с белками только в ориентированных мембранных препаратах типа мембранных везикул *E. coli* [1314]. Анализ можно сделать количественным, если использовать соответствующие иммунологические методы. Места связывания можно локализовать с помощью электронной микроскопии, пометив антитела коллоидным золотом или используя золото, связанное со специфичным комплексом антиген—антитело на поверхности мембраны [1198]. Ясно, что в процессе приготовления мембранного препарата не должны разрушаться нативные топографические структуры. Чем точнее данные о местах связывания антител, тем информативнее будут эти эксперименты. Если исследовать ориентированные мембраны с нормальной или вывернутой ориентацией, то с помощью поликлональных антител против определенного очищенного полипептидного фрагмента можно определить, имеет ли изучаемый белок участки, экспонированные на какой-либо одной стороне мембраны. Однако такие эксперименты не позволяют определить, какая часть белка экспонирована. Более детальную информацию можно получить с помощью двух подходов. Один состоит в использовании моноклональных антител, а второй предусматривает применение поликлональных антител против пептидов, соответствующих определенным областям белка.

Моноклональные антитела высокоспецифичны к определенным

эпитопам, или местам связывания на полипептиде. Наиболее полезны те из них, которые связываются как с белком в мембране, так и с денатурированными фрагментами белка, что позволяет изучать белки после их разделения с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН (например, методом вестерн-блоттинга). Это особенно важно для локализации места связывания антител на полипептиде. В принципе эпитоп можно локализовать с точностью до нескольких аминокислотных остатков. В качестве примеров успешного использования моноклональных антител можно привести родопсин [1110], бактериородопсин [1108, 1110] (разд. 3.5.2), ацетилхолиновый рецептор [1199] (разд. 8.2.4) и белок LamB — рецептор фага λ из наружной мембраны *E. coli* [325].

Использование антител против синтетических пептидов, соответствующих отдельным белковым фрагментам, позволяет точно выяснить, доступна ли эта область белка для связывания антитела. Если антитела, специфичные к определенной аминокислотной последовательности, связываются с нативной формой белка в мембране, то исследователь получает мощный инструмент для определения топографии белка. Этим путем можно проверять отдельные топографические модели. Примерами успешного использования данного подхода являются работы по лактозопермеазе *E. coli* [1314] (см. разд. 8.3.2), микросомному цитохрому P450 [306] и ацетилхолиновому рецептору [1199]. К сожалению, нет гарантий, что антипептидные антитела вообще будут связываться с белком. Потенциальный центр связывания в нативном белке может находиться в такой конформации или так быть упрятым внутри белковой глобулы, что не будет узан антителом или доступен для него. Действительно, в некоторых случаях антипептидные антитела не связываются с белком даже после его денатурации в ДСН [1314].

Весьма остроумным является подход к определению топографии полипептида, основанный на методах молекулярной генетики. Он состоит во введении чужеродного эпитопа в аминокислотную последовательность мембранного белка с последующим использованием антител, специфичных к этому эпитопу [422].

Химическая модификация

Этот подход широко использовался для локализации белков или их отдельных участков на поверхности мембраны или в ее гидрофобной области. Белок вступает в реакцию с реагентом, который может действовать лишь на одной стороне ориентированной мембраны или в ее гидрофобной сердцевине. Реагент, предназначенный для идентификации белка на поверхности мембраны, должен быть сильно полярным; он не должен адсорбироваться на мембране или накапливаться внутри ее. Для локализации же той части белка, которая нахо-

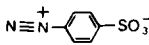
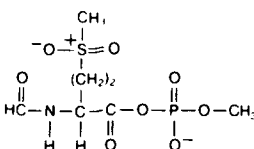
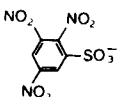
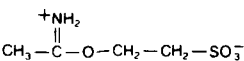
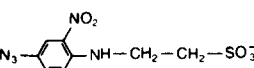
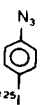
дится в контакте с углеводородными хвостами липидных молекул, следует использовать очень неполярные реагенты, которые концентрируются в гидрофобной области мембраны. Артефакты, возникающие при этом подходе, чаще всего бывают связаны с тем, что реагент модифицирует белок не только в том реакционном пространстве, для которого он был предназначен. Например, реагент, направленный на модификацию поверхности мембраны, может иметь достаточно неполярный характер, чтобы проникать через мембрану и получать доступ к белкам внутреннего компартмента. Химическая модификация может также привести к повреждению мембраны и сделать ее проницаемой для того реагента, который, как ожидается, должен быть непроницающим. В табл. 4.1 перечислены некоторые из химических реагентов, используемые для изучения топографии мембранных белков.

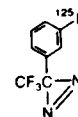
Модификацию белков на поверхности мембраны часто проводят с помощью фермента лактопероксидазы, которая катализирует иодирование доступных остатков тирозина или гистидина. Поскольку реакция между I^- и H_2O_2 происходит в активном центре лактопероксидазы, последняя должна быть в высшей степени «векторной», т. е. локализованной только на одной стороне мембраны. Однако при определенных условиях в ходе реакции может образовываться I_2 , который, проникая через мембрану, способен иодировать аминокислотные остатки на внутренней стороне мембраны [593]. Это показывает, насколько важен строгий контроль условий протекания реакции для исключения артефактов.

Для поверхностной модификации часто используются и другие реагенты — соли диазония, которые реагируют с боковыми цепями остатков лизина, цистеина, тироксина и гистидина, а также фотоактивируемые реагенты, например NAP-таурин (табл. 4.1).

В табл. 4.1 перечислен также ряд неполярных фотоактивируемых реагентов, которые используются для избирательной модификации аминокислотных остатков белка, контактирующих с гидрофобной областью бислоя. Эти реагенты обычно добавляют к мембранному препарату, дают им возможность накопиться в бислое и затем подвергают их фотоактивации. Преимущество образующихся при этом нитренов и карбенов состоит в том, что их реакции намного менее специфичны по сравнению с реакциями других активных частиц, так что ковалентная модификация не ограничивается боковыми цепями каких-либо определенных аминокислот. Правда, нитрены проявляют избирательность по отношению к нуклеофилам [1382]. Использование карбенов предпочтительнее, поскольку они вступают в реакцию с более высоким выходом. Для получения информации о вторичной структуре трансмембранных участков полипептидной цепи путем определения тех остатков, которые контактируют с липидами, использовали реагент ТИД [652, 157, 653]. Например, спираль С бак-

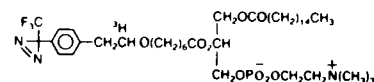
Таблица 4.1. Некоторые реагенты, применяемые для изучения топографии мембранных белков

Реагент	Мишень	Ссылки
1. Диазотированная сульфаниловая кислота (ДСК, DABS) 	Находящиеся на поверхности аминокруппы, остатки тирозина, гистидина, цистеина	[1182]
2. Формилметнионилсульфонметилфосфат (ФММФ) 	Находящиеся на поверхности аминокруппы фосфолипидов и белков	[145]
3. Тринитробензолсульфокислота (ТНБС) 	Находящиеся на поверхности аминокруппы фосфолипидов и белков	[1332, 1251]
4. Изетионилацетимидат (ИАИ) 	Находящиеся на поверхности аминокруппы фосфолипидов и белков	[1059]
5. N-(4-Азидо-2-нитрофенил)-2-аминотансульфонат (НАР-Таурин) 	Неспецифическая метка для групп, находящихся на поверхности. Фотоактивируется с образованием реакционноспособных нитренов	[1182]
6. 1-Азидо-4-[¹²⁵I]-иодбензол (АИБ) 	Неспецифическая метка для групп, погруженных в мембрану. Образует реакционноспособные нитрены	[296]

7. 3-(Триформетил)-3-м-[¹²⁵I]-иодфенил-диазириин (ТИД)

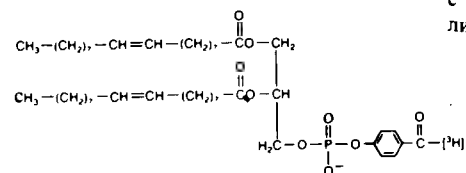
Неспецифическая метка для групп, погруженных в мембрану. Образует активные карбены

[962, 157, 653, 1116]

8. 1-Пальмитоил-2-[10-[4-[трифторметил-диазиририл]-фенил]-[9-³H]-8-оксаундеканол]-sn-глицеро-3-фосфохолин (ПТФХ)

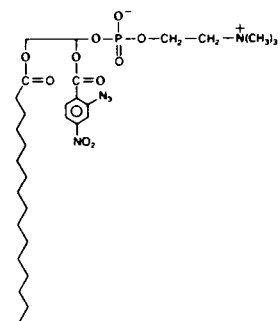
Неспецифическая метка для групп, погруженных в мембрану. Образует активные карбены

[158] (см. также другие метки, [1421])

9. 1,2-диолеилглицеро-3-(4-[³H]формил-фенилфосфат)

Аминогруппы белка, находящиеся в контакте с полярными группами липидов

[957]; см. также [6, 170]

10. 1-Пальмитоил-2-(2-азидо-4-нитробензоил)-sn-глицеро-3-[³H]фосфохолин

Неспецифическая метка для групп, погруженных в мембрану, но находящихся вблизи полярных головок липидов

[1182]

териородопсина (рис. 3.8, 3.9) включает метку лишь с одной стороны; это согласуется с представлением о том, что данная спираль является трансмембранной, причем ее неполярная область обращена в липидную фазу [157].

Локализация специфических центров

Ценную информацию иногда можно получить, определяя положение специфических центров в ряде белков. Например, места присоединения сахарных остатков в гликопротеинах плазматической мембраны всегда находятся на ее наружной поверхности, так что выявление их в полипептидной цепи имеет и топологическую ценность. Столь же информативными могут быть и данные о локализации сайтов модификации белка, например сайтов фосфорилирования, если локализация модифицирующего фермента известна [1003]. Так, в белках плазматической мембраны фосфорилированные аминокислотные остатки находятся на цитоплазматической стороне. Аналогичным образом может оказаться полезной локализация специфических мест связывания. Например, были идентифицированы места связывания бактериофага с экспонированными на поверхности клетки участками белков OmpA [1019] и LamB [227] наружной мембраны *E. coli*; для этого использовались мутантные белки.

Генетические подходы

Возможность генетической модификации мембранных белков привела к созданию новых подходов к их топографическому анализу. Такие методы, по всей вероятности, будут применяться все шире, однако пока число удачных примеров не столь велико, чтобы судить об их надежности и универсальности. Так, в белок OmpA методами генной инженерии были встроены в определенные места короткие пептиды [422], затем был проведен протеолиз и по его результатам определено, были ли участки, содержащие включенный пептид, экспонированы на поверхности клетки. Анализ мутантных вариантов позволил идентифицировать также места связывания фага и соответствующие эпитопы в белках, экспонированных на наружной стороне мембраны [325, 1019, 227].

Ценные данные о топографии белков цитоплазматической мембраны *E. coli* были получены и с помощью метода гибридизации белков [918, 11, 129]. Гибридные белки можно сконструировать так, что их N-концевой участок будет представлен мембранным белком, а на C-конце будет находиться каталитический центр щелочной фосфатазы. Щелочная фосфатаза обычно локализуется в периплазматическом пространстве *E. coli*, куда она транспортируется и где проявляет свою ферментативную активность. Синтез многих мембранных бел-

ков, по-видимому, осуществляется линейным образом, начиная с N-конца (гл. 10). Поэтому, если место сочленения, где начинается последовательность щелочной фосфатазы, локализовано на периплазматической стороне мембраны, то гибридный белок будет транспортироваться в периплазму и проявлять ферментативную активность. Если же место сочленения находится на цитоплазматической стороне, то щелочная фосфатаза в гибридном белке останется внутри клетки и будет проявлять низкую ферментативную активность. Следовательно, те места сочленения в гибридных белках, которые приводят к высокой активности щелочной фосфатазы, будут соответствовать наружным доменам мембранного белка.

4.2.2. ПРИМЕРЫ АНАЛИЗА ТОПОГРАФИИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Один из наиболее ярких примеров детального топографического анализа мембранного белка — это изучение бактериородопсина. Некоторые из проведенных исследований были рассмотрены в гл. 3. Как показывают данные по реконструкции изображения, бактериородопсин имеет семь трансмембранных сегментов, по-видимому представляющих собой α -спирали (см. рис. 3.7, 3.8). Результаты протеолиза, химической модификации и связывания антител согласуются с этой моделью, хотя точные границы трансмембранных сегментов не установлены.

Еще один белок, для которого получены непротиворечивые топографические данные, — это бычий родопсин [44, 1110] (рис. 4.1). В этом случае анализ первичной структуры тоже предполагает наличие семи трансмембранных α -спиралей с соединяющими их петлями. С такой моделью согласуются результаты изучения топографии с помощью антител и протеаз, а также данные о локализации мест фосфорилирования и присоединения углеводов. Обратите внимание, что хотя бактериородопсин и родопсин связывают одну и ту же простетическую группу — ретиналь — и, по-видимому, уложены в мембрану одинаковым образом, никакой гомологии в их аминокислотной последовательности не наблюдается и выполняют они разные функции. Бактериородопсин является бактериальным светочувствительным протонным насосом, а родопсин — это зрительный пигмент, содержащийся в палочках сетчатки. Под действием света родопсин претерпевает светозависимые конформационные изменения, инициируя целый каскад событий, конечным результатом которых является зрительный сигнал (гл. 9).

Большое внимание было уделено анализу топографии еще одного трансмембранного белка — ацетилхолинового рецептора (см. работу [1198] и разд. 8.2.4). Исходя из анализа первичной последовательности, было предложено несколько топографических моделей этого рецептора, адекватность которых проверялась с помощью иммуноло-

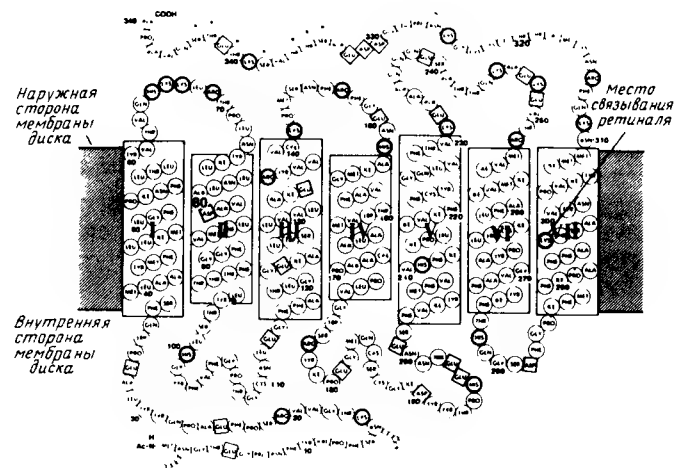


Рис. 4.1. Топографическая модель родопсина быка, предполагающая наличие семи трансмембранных спиралей [593a]. Отмечены места фосфорилирования (звездочки) и N-гликозилирования, а также остаток лизина в спирали VII, с которым связывается ретиналь. Полагают, что аспарат в спирали II играет роль протонатора для шиффового основания, образуемого ретиналем. Остатки цистеина 110 и 187, по-видимому, образуют дисульфидную связь. Обратите внимание на то, что пролин присутствует в пяти из семи трансмембранных спиралей. Рисунок любезно предоставлен д-ром Р. Нэграве.

гических методов. Следует, однако, отметить, что полученные данные весьма противоречивы; это означает, что применение этих методов не всегда является оправданным.

В качестве последнего примера можно привести микросомный цитохром b_5 [1421, 1420]. Этот белок функционирует как переносчик электронов, участвуя в некоторых окислительно-восстановительных реакциях в эндоплазматическом ретикулуме (гл. 6). Цитохром b_5 — это амфифильный белок, в котором гемсвязывающий каталитически активный домен (11 кДа) соединяется с помощью десяти аминокислотных остатков с неполярным доменом (5 кДа) — мембранным якорем. Эти два домена можно отделить друг от друга путем протеолиза. Структуру гемсвязывающего фрагмента изучали методом рентгеноструктурного анализа. Строение якорного пептида на С-конце белка неизвестно. Топографические исследования, проводившиеся в нескольких лабораториях, были направлены на выяснение одного простого вопроса: пересекает ли этот якорь бислой или он погружен в него только наполовину и, сделав петлю, идет обратно, так что его N- и С-концы оказываются по одну сторону мембраны? Несмотря на все усилия, окончательный ответ на этот вопрос пока не получен. В большинстве исследований использовался очищенный ци-

тохромом b_5 , встроенный в фосфолипидные везикулы. Проблема состоит в том, что разные методики реконструкции дают разные конформации белковой молекулы. При «непрочном» связывании цитохрома b_5 С-конец доступен для карбоксипептидазы Y и локализован на той же стороне, что и гемсвязывающий домен. Однако с помощью определенных методик можно получить «прочно» связанный домен, в котором С-конец недоступен для протеолиза, что, вероятно, отвечает топографической ориентации белка *in vivo*. Корана и др. пытались решить этот вопрос, изучая модификацию двух форм этого белка с помощью фотоактивируемых аналогов фосфолипидов (см. работы [1421, 1420] и табл. 4.1). Они пришли к выводу, что в «прочно» связанной форме белка мембранный якорь пронизывает бислой. Этот вывод, однако, не нашел полной поддержки [1267, 48]. Другие подходы (такие, как исследование передачи энергии электронного возбуждения, рассеяние рентгеновских лучей и нейтронов или методы химической модификации) либо вообще не позволили сделать выбор в пользу той или иной модели, либо дали противоречивые результаты [1267, 48].

Все сказанное выше показывает, что в отсутствие структурных данных высокого разрешения трудно определить способ укладки интегральных белков в мембране. И в самом деле, число белков, для которых это удалось сделать, очень мало.

4.3. Цитоскелет

В принципе как трансмембранное, так и латеральное распределение мембранных компонентов может зависеть от их взаимодействия со структурами, находящимися на поверхности мембраны. В ряде случаев такая зависимость была четко выявлена, в частности с этим связан все более возрастающий интерес к взаимодействию мембраны с цитоскелетом. Цитоскелет — это сложная сеть волокон разного типа, обнаруженная в эукариотических клетках [99, 574]. У прокариотических клеток ничего подобного не выявлено. Основная функция этой системы, по-видимому, связана с механикой клетки. Цитоскелет обеспечивает механическую опору для плазматической мембраны и тем самым определяет форму клетки [380], а также местоположение клеточных органелл и их перемещение при митозе. С подвижностью внутриклеточных мембранных везикул связаны такие процессы, как эндоцитоз, экзоцитоз и фагоцитоз, а также перемещения плазматической мембраны при амебодном движении клеток. Все эти процессы осуществляются с участием цитоскелета. По сути цитоскелет является динамическим каркасом клетки, который реагирует как на внутренние, так и на внешние стимулы. Часть этой системы тесно связана с плазматической мембраной. В настоящее время лучше всего оха-

рактизован мембранный скелет эритроцитов млекопитающих [82]. Менее детально изучены биохимические свойства цитоскелета микроворсинок щеточной каемки кишечного эпителия [1015]. Обычно цитоскелет представляет собой трехмерную сеть волокон, охватывающую всю клетку. В некоторых точках он прикреплен к плазматической мембране, и эти области, как известно, участвуют в межклеточных контактах или в фокальных контактах, с помощью которых клетки прикрепляются к субстрату в клеточных культурах.

Предполагается, что именно благодаря взаимодействиям цитоскелета с мембраной возникает трансмембранное распределение липидов (разд. 4.4), стабилизируются латеральные белковые домены (разд. 4.5) и обеспечивается направленное перемещение белков в мембране (гл. 5).

Цитоскелетную сеть образуют три типа волокон: 1) микрофиламенты (диаметром ~ 60 Å), состоящие из актина и связанных с ним белков; 2) промежуточные филаменты (диаметром 80—100 Å), состоящие из кератин и родственных им белков; 3) микротрубочки (диаметром 230 Å), состоящие из тубулина. В биохимическом отношении лучше всего изучено связывание с мембраной актиновых микрофиламентов [597, 598]. Особого рассмотрения здесь заслуживает актин-спектриновая сеть эритроцитов [82].

4.3.1. МИКРОФИЛАМЕНТЫ

Это волокнообразные формы актина. В разных тканях идентифицировано не менее 20 белков, связанных с актином [99, 598]. Эти белки способствуют объединению актиновых волокон в пучки, прикрепляют филаменты к мембране, образуют сшивки в актине, регулируют длину филаментов, влияют на их сократительную способность и обеспечивают отклик на Ca^{2+} . В ряде случаев актин участвует в сократительной активности. Микрофиламенты разрушаются цитохалазинами.

Микрофиламенты могут располагаться параллельно цитоплазматической мембране, как в сократимом кольце в делящейся клетке, или могут быть связаны с плазматической мембраной одним своим концом, как в местах адгезии в области контакта клетка—клетка или клетка—субстрат. Полагают, что связывание актина с мембранами обеспечивается несколькими мембранными белками (см., например, [99, 598, 1236, 1455, 915]). Из данных о физической близости микрофиламентов к мембране, о биохимических взаимосвязях микрофиламентов и разрушающем воздействии цитохалазина следует, что микрофиламенты участвуют во многих мембранных процессах, в частности в опосредуемом рецепторами эндоцитозе, пэтчинге и кэппинге, клеточной подвижности и цитокинезе. С биохимической точки зрения лучше всего охарактеризованы взаимодействия актина с мембраной у эритроцитов (разд. 4.3.4).

4.3.2. ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ

Это полимеры, состоящие из одного или двух фибриллярных полипептидов, которые различаются в клетках разного типа [99, 1101, 458] и кодируются семейством мультигенов. Примером являются кератины из эпителиальных клеток и виментин из клеток мезенхимы. Функции промежуточных филаментов неизвестны. Мало что можно сказать и о биохимической основе их взаимодействия с мембранами [506, 1138].

4.3.3. МИКРОТРУБОЧКИ

Они состоят из тубулина, который хорошо охарактеризован и представляет собой $\alpha\beta$ -гетеродимерный белок. Микротрубочки образуют цитоплазматическую сеть, которая, как полагают, связывает плазматическую мембрану с органеллами, например с митохондриями [99]. Вдоль микротрубочек, по-видимому, происходит перемещение эндосом и лизосом [939]. Есть доказательства, что тубулин прикрепляется к мембранам в особых точках [1043, 93, 58]. Выделен мембранный белок синапсин I, который, по-видимому, взаимодействует с тубулином [58]. В ходе митоза цитоплазматическая сеть микротрубочек распадается и перестраивается в митотическое веретено. Микротрубочки разрушаются под действием колхицина.

4.3.4. МЕМБРАНА И ЦИТОСКЕЛЕТ ЭРИТРОЦИТОВ

Наиболее детально изучены мембрана и цитоскелет эритроцитов млекопитающих [82, 571]. В табл. 4.2 перечислены основные белки, которые были разделены с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Цифровые обозначения полипептидов связаны с их относительной электрофоретической подвижностью в геле. При промывании мембраны растворами с низкой ионной силой удаляются периферические мембранные белки, к которым прежде всего относятся компоненты цитоскелета. Основными интегральными белками цитоскелета являются белок полосы 3 и гликофорины А, В и С. Белок полосы 3 представляет собой анионный переносчик (см. разд. 8.3.3), а функции гликофоринов, относящихся к классу гликопротеинов, неизвестны (см. рис. 3.17). В электронном микроскопе цитоскелет выглядит как упорядоченная сеть на внутренней стороне мембраны [173]. Как видно из табл. 4.2, белки цитоскелета являются основными мембранными компонентами, и это облегчает их биохимическую характеристику. По сути белковый каркас [865] состоит из спектрин-актинового комплекса, который связан с плазматической мембраной благодаря взаимодействиям как с белком полосы 3, так и с гликофорином; эти взаимодействия осуществляются с помощью специальных белков — ан-

Таблица 4.2. Свойства, степень ассоциации и функции эритроцитарных мембранных белков ¹⁾

Пептидная фракция	M_r	Число молекул на клетку $\times 10^{-5}$	Степень ассоциации	Функция	Связь с белками
Полоса 1 (спектрин)	240 000	2,2	Димеры полос 1 и 2 образуют тетрамеры и олигомеры	Участвует в формировании мембранного скелета	Полоса 3 (с полосой 1) Анкирин (с полосой 2) Полоса 4.1
Полоса 2 (спектрин)	220 000				
Полоса 2.1 (анкирин)	210 000	1,1	Мономер	Связывает спектрин с мембраной через белок полосы 3	Спектрин Полоса 3
Полоса 2.2 (анкирин)	183 000				
Полоса 2.3 (анкирин)	165 000				
Полоса 3	95 000	12	Тетрамер в равновесии с димерами	Транспорт неорганических анионов; место прикрепления скелета	Анкирин Полоса 4.1(?) Полоса 4.2 Гликолитические ферменты
Полоса 4.1a Полоса 4.1b	80 000	2,3	Димер (?)	Связывает скелет с интегральными белками; стабилизирует спектрин-актиновые взаимодействия	Спектрин Гликофорин
Полоса 4.2	72 000	2,3	Тетрамер	Неизвестна	Полоса 3
Полоса 4.5/1	59 000	1,3		Системы транспорта моносахаридов, вероятно L-лактата и нуклеозидов	
2		1,4			
3		0,7			
4		1,0			
5		1,3			
6	52 000	1,3			

Полоса 4.9	48 000	1		Связывание актина?	Актин (?)
Полоса 5 (актин)	43 000	5,1	Олигомеры из ~ 12 мономеров	Участвует в формировании мембранного скелета	Спектрин Полоса 4.1
Полоса 6	35 000	4,1	Тетрамер	Глицеральдегид-3-Р-дегидрогеназа	Полоса 3
Полоса 7	29 000		?	?	?
Гликофорин А	29 000	2	Димер	Место прикрепления скелета	
Гликофорин В	↓	0,7			Полоса 4.1
Гликофорин С	~ 25 000	0,35			

¹⁾ Из работы [571] с изменениями.

кирина и белка полосы 4.1 (рис. 4.2). Основные компоненты были очищены до гомогенного состояния и изучены *in vitro*. Комплексы между основными белками, такими, как белок полосы 3 и анкирин или анкирин и спектрин, характеризуются константами диссоциации порядка 10^{-7} М, которые могут меняться в физиологических условиях. Фосфорилирование анкирина влияет на его аффинность по отношению к спектрину [877], а взаимодействие между белком полосы 4.1 и гликофоорином, по-видимому, модулируется фосфатидилинозитолами [37].

Интересно, что белки, близкородственные компонентам цитоскелета эритроцитов, обнаружены в ряде неэритроидных клеток. Большой интерес к цитоскелету эритроцитов, по всей вероятности, обусловлен тем, что данная система не является уникальной лишь для этих клеток, а представлена в виде кортикального цитоскелета и в клетках другого типа. Рассмотрим свойства некоторых цитоскелетных белков.

1. *Спектрин*. Это тетрамер типа $(\alpha\beta)_2$, в котором два гетеродимера $\alpha\beta$ объединены по схеме «конец-к-концу». Молекула может достигать в длину 2000 Å (в случае тетрамера). Спектрин (β -цепь) связан с анкирином и белком полосы 3 по сайтам, расположенным на противоположных концах молекулы. Кроме того, спектрин связан с актином, возможно, в комплексе с белком полосы 4.1. Спектринопо-

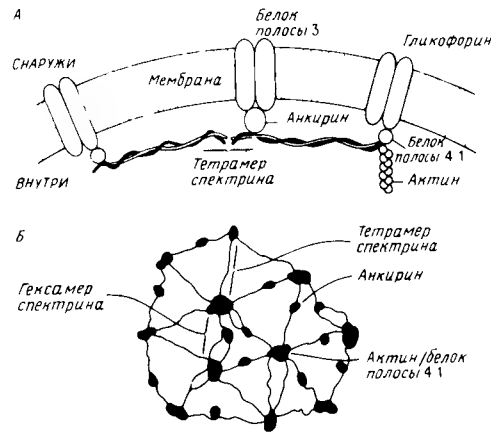


Рис. 4.2. Схематическое изображение цитоскелета эритроцита [865]. А. Поперечное сечение мембраны, на котором видны основные белковые компоненты. Анкирины и белок полосы 4.1 обеспечивают взаимодействие между спектрин-актиновым комплексом и трансмембранными белками полосы 3 и гликофорин соответственно. Спектрин, вероятно, свернут, а не растянут полностью, как показано на рисунке [380]. Б. Изображение распластанного мембранного скелета, полученное по данным электронно-микроскопического исследования негативно контрастированного препарата. Указано предполагаемое положение различных ассоциатов (актин/белок полосы 4.1, анкирин, тетрамеры и гексамеры спектрина).

добные молекулы, например фодрин [519], обнаружены в клетках разного типа.

2. **Актин.** Это глобулярный белок, который существует в виде линейных олигомеров, содержащих по 12—18 молекул. Они выглядят на электронных микрофотографиях как короткие стержни, к которым может быть прикреплено до шести спектриновых тетрамеров [173].

3. **Анкирин.** Это наиболее охарактеризованный растворимый белок, обеспечивающий взаимодействия между интегральными мембранными белками и цитоскелетом. Он имеет отдельные домены, ответственные за независимое связывание со спектрином и с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 [575]. Анкирин был обнаружен и в незритроидных клетках [292, 1058].

4. **Белок полосы 4.1.** Он также относится к классу белков, обеспечивающих связь цитоскелета с мембраной. Белок полосы 4.1 связывается со спектрином и актином [247], а также с гликофорин [36]. Кроме того, при определенных условиях он может связываться и с белком полосы 3 [1127]. Белку полосы 4.1, по-видимому, родствен синапсин I, обнаруженный в мембране синаптических везикул [57].

5. **Белок полосы 3.** Это основной анионный переносчик в эритро-

цитах (см. разд. 8.3.3). Цитоплазматический домен содержит на N-конце кислый участок, который связывается с некоторыми гликолитическими ферментами (см. разд. 6.7.2), а также с гемоглобином. Цитоплазматический домен не участвует в транспорте анионов. Его сегмент, расположенный вблизи мембраны, связывается с анкирином (белок полосы 2.1) и с белком полосы 4.2 [779]. На основании анализа аминокислотной последовательности было высказано предположение, что белок полосы 3 имеет 12 трансмембранных сегментов [774], но полученные к настоящему времени экспериментальные данные не позволяют ни подтвердить, ни опровергнуть это положение [708].

6. **Гликофорин А.** Это основной сиалосодержащий гликопротеин; в отличие от белка полосы 3 он имеет относительно небольшой цитоплазматический домен и один трансмембранный сегмент (см. рис. 3.17). Полагают, что этот белок связывается с белком полосы 4.1 [82]. Другие его функции неизвестны.

4.4. Трансмембранная асимметрия липидов

Мембранные белки, находясь в плоскости бислоя, не меняют свою топологическую ориентацию. Они встраиваются в мембрану в строго определенной ориентации (абсолютная асимметрия) и остаются в таком положении в течение всего времени их жизни. Липиды в ряде биологических мембран, напротив, с довольно большой частотой мигрируют с одной стороны мембраны на другую (флипп-флоп) (см. разд. 4.4.3). Определить скорость трансмембранной миграции липидов очень важно по двум причинам: это помогает понять природу липидной асимметрии и позволяет критически оценить пригодность методов, используемых для нахождения распределения липидов между двумя сторонами бислоя. Чтобы измерения содержания, например, фосфатидилсерина на наружной стороне мембранных везикул были достоверными, они должны быть завершены до того, как фосфатидилсерин из внутреннего монослоя переместится в наружный. Некоторые методы установления липидной асимметрии модифицируют саму изучаемую систему и индуцируют трансмембранную миграцию липидных молекул, поэтому полученные результаты бывает трудно интерпретировать. Детальная оценка достоинств и недостатков методов изучения липидной асимметрии в мембранах дается, например, в обзорах [1097, 1096].

4.4.1. МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ТРАНСМЕМБРАННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Химическая модификация фосфолипидов

Относительно легко подвергаются химической модификации только аминокислоты, например фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин. При этом мембранный препарат с известной топологической ориентацией обрабатывают реагентом, который не проникает через бислой и ковалентно связывается со свободными аминогруппами тех аминокислот, которые находятся только на наружной поверхности мембраны. Чаще всего с этой целью используют ТНБС (см. табл. 4.1). Доля фосфатидилэтаноламина, вступившего в реакцию, должна служить мерой его содержания на наружной стороне мембраны. Очевидно, однако, что такой вывод неправилен, если реакция не доходит до конца или если в ходе реакции значительное количество фосфатидилэтаноламина перемещается с внутренней стороны мембраны на наружную и становится доступным для реагента. Как правило, в реальной ситуации имеют место оба обстоятельства, что значительно осложняет интерпретацию результатов.

Предложен вариант этого подхода, предусматривающий синтез аналогов фосфолипидов с реакционноспособными сульфгидрильными группами с последующим использованием непроницающих реагентов, избирательно реагирующих по SH-группам [488]. Естественно, что эти липидные аналоги следует включать в изучаемые мембраны перед обработкой реагентами, и желательно предварительно исследовать их поведение в модельных системах.

Фосфолипидный обмен

Спонтанный обмен фосфолипидами между мембранами, как правило, протекает с пренебрежимо малой скоростью. Однако были выделены белки, называемые липидпереносящими белками (ЛПБ), которые катализируют обмен (см. работу [616] и разд. 10.4.2). Эти белки чаще всего выделяют из тканей млекопитающих. Наиболее изучен белок из печени крысы, который обладает абсолютной специфичностью по отношению к фосфатидилхолину и катализирует его обмен между мембранами. Большинство других липидпереносящих белков менее специфичны к полярным головкам липидных молекул. Это растворимые белки, которые имеют высокоаффинные места связывания фосфолипидных молекул. Механизм обмена неизвестен, однако ЛПБ можно использовать для изучения липидной асимметрии, поскольку они связывают липиды только наружной поверхности бислоя, с которыми они контактируют. Обычно мембранные везикулы инкубируют с избытком липосом [1494], содержащих

радиоактивно меченный фосфолипид, в присутствии липидпереносящего белка. Фосфолипидный обмен со стехиометрией 1:1, который катализируется указанными белками, не приводит к изменению состава мембран (например, эритроцитов или липосом), при этом степень обмениваемости фосфолипидов можно определить, измерив удельную радиоактивность мембраны. Если фосфолипид в мембране полностью доступен для обмена, то его удельная радиоактивность в липосомах и мембранах в конце эксперимента будет одинаковой. Если же изучаемый липид на внутренней стороне мембраны недоступен для обмена, то его удельная радиоактивность в мембране будет ниже, чем в липосомах. Если трансмембранная миграция протекает медленнее, чем устанавливается равновесие при обмене, то удельная радиоактивность будет возрастать во времени, и это возрастание будет отражать скорость флип-флопа. При проведении этих экспериментов необходимо отделять липосомы от изучаемых мембран; для этого обычно используют центрифугирование.

Достоинство этой методики состоит в том, что ЛПБ не проникают через мембрану, недостаток же связан с тем, что равновесие устанавливается медленно, за несколько часов или даже больше. Поэтому данная методика неприменима, когда происходит быстрая трансмембранная миграция, но ее можно использовать в сочетании с другими методами. Например, можно провести обмен радиоактивных липидов, находящихся на наружной поверхности бислоя, а затем использовать фосфолипазы для оценки скорости, с которой эти липиды мигрируют с наружной стороны мембраны на внутреннюю (см. работы [986, 1098] и рис. 4.5).

Фосфолипазы

Фосфолипазы — это ферменты, гидролизующие фосфолипиды по связям, указанным на рис. 4.3. Фосфолипазы представляют собой

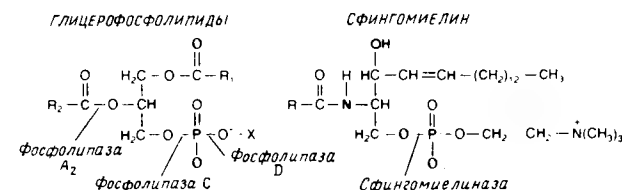


Рис. 4.3. Связи, расщепляемые некоторыми хорошо охарактеризованными фосфолипазами [1096]. Фосфолипаза D катализирует обмен полярных головок в фосфолипидных молекулах. Существует также фосфолипаза A1, расщепляющая сложноэфирную связь в положении 1, но она недостаточно хорошо охарактеризована (см. обзор [1486]).

растворимые белки, которые взаимодействуют только с наружной поверхностью бислоя и поэтому являются ценным инструментом для изучения асимметрии фосфолипидов и скорости их трансмембранной миграции. При работе с фосфолипазами следует иметь в виду два момента: 1) не все фосфолипиды на наружной стороне мембраны легко вступают в реакцию; 2) продукты реакции (например, лизофосфолипиды) обычно дестабилизируют бислой. Даже если при действии фосфолипаз целостность бислоя не нарушается, скорость трансмембранной миграции фосфолипидов может существенно возрасти [41]. Поэтому ход реакции необходимо тщательно контролировать, а выводы, сделанные на основании полученных результатов, — критически анализировать.

Другие методы

Для установления трансмембранного распределения липидов были предложены и другие специальные методы. Рассмотрим некоторые из них.

1. Распределение *кардиолипина* можно определить по специфичному связыванию с ним адриамицина [208].

2. Распределение *гликолипидов* можно определить, окисляя их либо галактозооксидазой, либо периодатом натрия с последующим восстановлением ³H-боргидридом натрия [1410].

3. Распределение *стеролов* можно определить несколькими методами [92]. Стероиды могут самопроизвольно обмениваться между мембранами даже без участия особых белков [154]. Поэтому их присутствие в наружном монослое мембраны можно определить по переносу в липосомы или из липосом [226]. Распределение холестерина между двумя сторонами мембраны устанавливали, изучая кинетику образования комплекса между ним и филопином [1309, 226]. Наконец, для определения содержания холестерина в наружном монослое мембраны использовали холестеролоксидазу, однако возникающие при этом артефакты ставят возможность применения этого фермента под сомнение [1452].

4.4.2. ПРИМЕРЫ ЛИПИДНОЙ АСИММЕТРИИ

Из-за экспериментальных трудностей, связанных с определением липидной асимметрии, можно привести лишь несколько примеров, в которых асимметрия несомненно доказана. Прежде всего следует упомянуть эритроциты человека, которые в этом отношении были детально изучены, причем все использованные методы дали хорошо согласующиеся между собой результаты. Другой пример такого рода — это высокая степень асимметрии наружной мембраны грамотрицательных бактерий; впрочем, эта мембрана необычна в том от-

ношении, что ее основным компонентом является уникальный липополисахарид. Нет никаких сомнений, что асимметричное распределение липидов свойственно и другим биологическим мембранам, однако убедительные данные получены лишь в немногих случаях.

Липидная асимметрия в фосфолипидных везикулах

Для малых мономеллярных везикул (ММВ; см. разд. 2.5.5), состоящих из двух разных липидов, характерно асимметричное распределение липидов [1097, 802]. Например, в везикулах, состоящих из смеси фосфатидилхолина с другими липидами, наружный монослой обогащен сфингомиелином или фосфатидилглицеролом, а фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол и фосфатидная кислота предпочитают находиться на внутренней поверхности. Общеизвестно, что в этих случаях липидная асимметрия возникает прежде всего из-за различий в упаковке молекул на двух сторонах бислоя ММВ. Липиды с более объемными полярными головками стремятся находиться в наружном монослое, потому что там больше площадь поверхности, приходящейся на молекулу (гл. 2). Однако биологические мембраны, за отдельными исключениями, не имеют участков со столь большой кривизной, так что эти выводы нельзя безоговорочно распространить на любые биологические мембраны. С помощью трансмембранного градиента pH липидную асимметрию можно индуцировать и в больших мономеллярных везикулах [650].

Липидная асимметрия в эритроцитах человека

Четко показано, что распределение липидов в мембране эритроцитов в высшей степени асимметрично. Как видно из рис. 4.4, фосфатидилхолин и сфингомиелин находятся преимущественно в наружном монослое, тогда как фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин — в основном во внутреннем.

Имеются убедительные данные о том, что для сохранения липидной асимметрии необходима целостность цитоскелета [347]. Она нарушена в клетках, дефицитных по спектрину или белку полосы 4.1 [1004]. Воздействия, нарушающие цитоскелет [347], изменяют и липидную асимметрию, хотя неясно, являются ли эти эффекты прямым следствием повреждения цитоскелета [457]. Кроме того, в малых везикулах, полученных из мембраны эритроцитов, распределение липидов менее асимметрично [802, 1309]. Эти данные показывают, что цитоскелет играет определенную роль в поддержании липидной асимметрии. Механизм такого влияния неясен, однако можно предположить, что имеет место прямое связывание цитоскелетных белков с аминифосфолипидами [347, 1591].

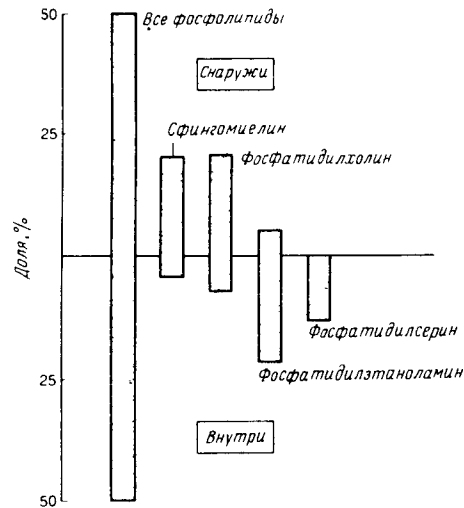
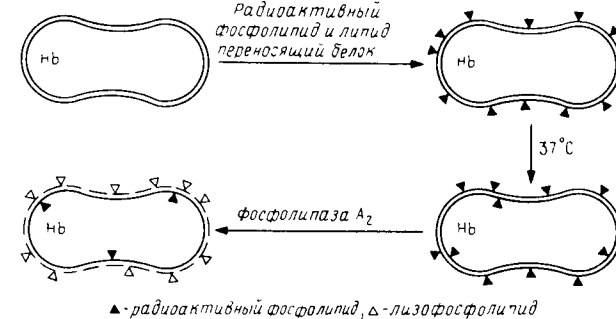


Рис. 4.4. Распределение основных липидов в мембране эритроцита человека [1510].

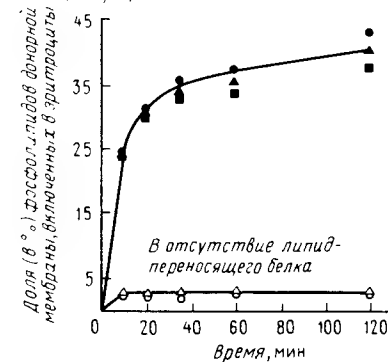
Прямая стабилизация асимметрии, если она существует, — это только одна сторона вопроса. Так, экзогенные фосфолипиды, включенные в мембрану эритроцитов с помощью обменивающих белков, примерно через сутки перераспределяются, и их асимметрия принимает такой же характер, как и у эндогенных липидов [985, 1455]. На рис. 4.5 приведена схема этих экспериментов. Измеряя кинетику гидролиза под действием фосфолипаз, можно определить скорость флип-флопа липидных молекул (рис. 4.5). Эта скорость возрастает в ряду фосфатидилсерин > фосфатидилэтаноламин > фосфатидилхолин > сфингомиелин. Подобные результаты были получены с помощью спин-меченных липидов [1628] и лизофосфолипидов [89]. Таким образом, те липиды, которые локализуются на внутренней стороне мембраны, имеют и относительно большую скорость трансмембранной миграции. Те же липиды, которые находятся на наружной стороне, мигрируют значительно медленнее либо вообще не совершают флип-флоп-перескоков.

Очень важным является вывод о том, что быстрая трансмембранная миграция аминофосфолипидов, по-видимому, является АТФ-зависимой и значительно замедляется в клетках, дефицитных по АТФ [1455, 1628]. Это послужило основанием для предположения о том, что специфичный флип-флоп липидов катализируется особыми ферментами типа транслоказ [1628]. В пользу этого предположения появляется все больше данных (см. разд. 4.4.3), правда, многие из них являются косвенными.

А. Схема исследования флип-флопа



Б. Перенос фосфолипидов из везикул в эритроциты



В. Трансмембранная миграция экзогенных фосфолипидов

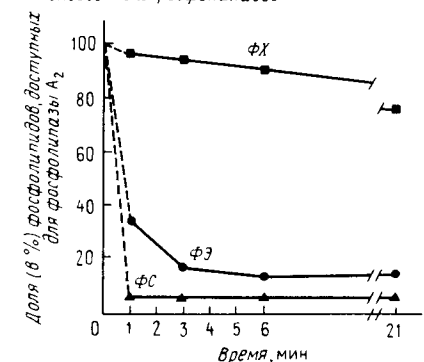


Рис. 4.5. А. Определение скорости флип-флоп-переходов фосфолипидов в мембране эритроцита [1098]. С помощью липидпереносящего белка радиоактивные фосфолипиды включают в наружный слой мембраны эритроцитов. После выделения и промывания клетки инкубируют, с тем чтобы радиоактивные липидные молекулы перешли во внутренний слой. Обработав препарат фосфолипазой A_2 , определяют, какая часть фосфолипидов, изначально находившихся на наружной стороне мембраны, мигрировала через мембрану и стала недоступной для фосфолипазы. Б. Кинетика переноса радиоактивных фосфолипидов из моноламеллярных везикул в эритроциты в присутствии и в отсутствие фосфолипидпереносящего (обменивающего) белка [1455]. Данные для фосфатидилхолина (квадратики), фосфатидилэтаноламина (кружки) и фосфатидилсерина (треугольники) совпадают. В. Трансмембранная миграция экзогенных фосфолипидов, исследуемая по схеме, представленной на рис. А [1455]. ФХ — фосфатидилхолин, ФЭ — фосфатидилэтаноламин, ФС — фосфатидилсерин.

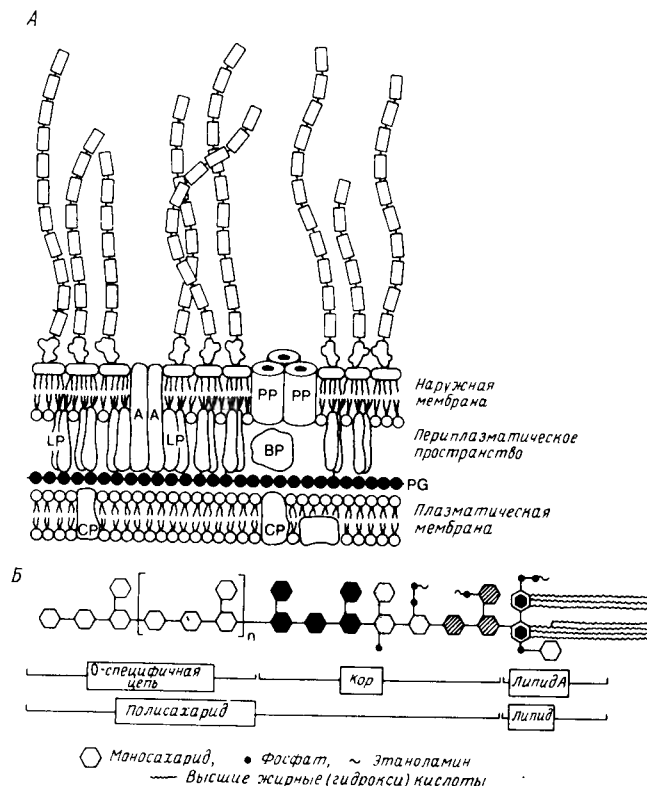


Рис. 4.6. А. Молекулярная организация наружной мембраны грамотрицательных бактерий [885]. Изображены цитоплазматическая мембрана, периплазматическое пространство и наружная мембрана. В наружную мембрану включены три белка: LamB (PP), OmpA (A) и основной липопротеин (LP). В периплазматическом пространстве присутствует связывающий белок (BP), ответственный за транспорт растворенных веществ, и имеется тонкая пептидогликановая клеточная стенка (PG). Показан также белок цитоплазматической мембраны (CP). Б. Схематическое представление структуры липополисахарида из *Salmonella typhimurium* [882]. Число связанных гидроксильных жирных кислот условно.

Есть два взгляда на то, как поддерживается липидная асимметрия в мембранах; они взаимно дополняют друг друга и могут быть в равной степени важны. Один из них дает статическую картину с акцентом на стабилизацию асимметрии за счет специфических взаимодействий фосфолипидов с цитоскелетными белками, а другой представляет асимметрию как динамический феномен, когда энергозависимые транслоказы избирательно переносят липиды через бислой,

поддерживая их стационарное асимметричное трансмембранное распределение [1591].

Липидная асимметрия наружной мембраны бактериальных клеток

Наружная мембрана грамотрицательных бактерий в отличие от мембраны эритроцитов не может служить моделью других бактериальных мембран. Это связано с тем, что содержащийся в ней липополисахарид является в своем роде уникальным мембранным компонентом. Детальные исследования (см., например, [1068, 855]) показали, что эта мембрана представляет собой высокоасимметричную структуру (рис. 4.6). Указанный липополисахарид был обнаружен только на наружной стороне бислоя, а большая часть фосфолипидов (а возможно, и все) локализована во внутреннем монослое, обращенном в периплазму. Липополисахарид играет важную роль как барьер для проникновения внутрь клетки некоторых веществ; в частности, именно благодаря ему бактерии приобретают устойчивость к ряду антибиотиков [806]. Одним из основных компонентов наружной мембраны является так называемый липопротеин Брауна, который закреплен в мембране с помощью ковалентно связанных с ним липидов (см. разд. 3.8), а кроме того, связан с пептидогликановой стенкой за счет ковалентных и нековалентных взаимодействий [1068, 885].

4.4.3. ТРАНСМЕМБРАННАЯ МИГРАЦИЯ ЛИПИДОВ

Биосинтез фосфолипидов и сборка мембраны протекают асимметрично (см. разд. 10.4). Активные центры ферментов биосинтеза фосфолипидов локализованы на одной, а не на двух сторонах мембраны. Например, фосфолипиды синтезируются и внедряются в мембрану на цитоплазматической стороне эндоплазматического ретикула пачени крысы [103] и на внутренней стороне бактериальной цитоплазматической мембраны. Ясно, что эти липиды должны пересечь мембрану, чтобы достичь противоположной стороны бислоя. Для измерения скорости перемещения липидов в ряде мембранных систем использовались методы, рассмотренные в этой главе ранее.

Скорость трансмембранной миграции фосфолипидов в фосфолипидных везикулах пренебрежимо мала: ее характерное время составляет несколько суток [1097, 488]. Флип-флоп-переход может ускоряться в присутствии таких интегральных мембранных белков, как гликофорин, или при возмущениях в бислой, происходящих, например, при обработке фосфолипазами [1097]. Как и следует ожидать, перемещение липидных молекул затрудняют именно полярные головки, поскольку производные диацилглицерола очень быстро мигрируют через бислой ($t_{1/2} < 15$ с) [103]. Для некоторых биологических мембран, например мембраны вируса гриппа и внутренней мем-

браны митохондрий, также характерна очень малая скорость трансмембранной миграции фосфолипидов [1097, 103].

Однако имеются мембраны, в которых миграция липидов протекает очень быстро, с $t_{1/2}$ порядка нескольких минут. Такие данные получены для эндоплазматического ретикулума печени крысы [670, 735], а также для цитоплазматической мембраны грамположительных бактерий *B. megaterium* [1251]. В этих мембранах происходит синтез липидов, и в них, по-видимому, присутствуют специальные транслоказы, которые обеспечивают быструю трансмембранную миграцию липидных молекул. Такое предположение было высказано в отношении эндоплазматического ретикулума [103], но оно пока не нашло экспериментального подтверждения. Характерное время трансмембранной миграции липидов в мембране эритроцитов имеет промежуточное значение и составляет величины порядка нескольких часов в зависимости от структуры изучаемого липида [985, 1455]. Такие же результаты были получены при измерении скорости флип-флопа спин-меченных аналогов фосфолипидов и экзогенных лизофосфолипидов [1004, 1628, 89]. Было установлено, что скорость миграции возрастает при нарушениях цитоскелета [1098, 1004], а также под действием агентов, влияющих на структуру липидного бислоя (например, грамицидина А) [224]. Возможно, цитоскелет играет определенную роль в уменьшении скорости миграции липидов через бислой благодаря связыванию аминокислотных фосфолипидов [1591]. Характерно, что ни эндоплазматический ретикулум, ни бактериальная цитоплазматическая мембрана, для которых характерна высокая скорость флип-флопа липидов, не связаны с цитоскелетом.

Тот факт, что скорость трансмембранной миграции липидов в эритроцитах является АТР-зависимой [1455, 1628], предполагает присутствие в этой мембране энергозависимой транслоказы. АТР-зависимая трансмембранная миграция аминокислотных фосфолипидов наблюдается также в плазматической мембране фибробластов [929] и лимфоцитов [1627]. Однако ни одна из фосфолипидных транслоказ до сих пор не выделена, поэтому возможность существования таких ферментов и их потенциальная роль в поддержании липидной асимметрии или в биогенезе мембран представляются вероятными, но не более того.

4.5. Латеральная гетерогенность мембран

Исходная жидкостно-мозаичная модель (см. гл. 1) предполагает, что распределение белковых и липидных компонентов в плоскости бислоя является гомогенным. Однако не вызывает сомнений, что в ряде мембран существуют домены или области, отличающиеся по составу от остальной части мембраны вследствие ограничений в диффузионном обмене их компонентов. Имеются различные виды

мембранных доменов, о которых можно говорить в рамках жидкостно-мозаичной модели, вводя определенные ограничения, налагаемые дополнительными стабилизирующими эти домены взаимодействиями.

1. *Макроскопические домены*, как правило, представляют собой обширные участки на поверхности клетки с характерной морфологией и четкими границами (барьерами). Примерами являются апикальная и базолатеральная области поляризованных эпителиальных клеток (рис. 1.2). В тилакоидах соприкасающиеся (уложенные в стопки) и несоприкасающиеся (обращенные в сторону стромы) участки фотосинтезирующих мембран тоже имеют разный состав и, по-видимому, стабилизируются межмембранными взаимодействиями в стопках.

2. *Агрегация белков* в плоскости мембраны может приводить к образованию довольно больших островков, или доменов, которые обогащены определенным белком и находятся в смеси с какими-либо другими компонентами. Примерами являются пурпурные мембраны *H. halobium*, содержащие бактериородопсин (разд. 3.5.2), или щелевые контакты, содержащие коннексин (разд. 8.2.1).

3. *Домены, формируемые при участии цитоскелета*, в принципе могут образоваться путем ассоциации определенных мембранных белков за счет их взаимодействия с внутриклеточными белками. В основе такой латеральной организации мембранных белков могли бы лежать особенности взаимодействий, наблюдаемых в случае цитоскелета эритроцитов. Пока четкие примеры существования таких доменов отсутствуют, однако можно предположить, что пэтчинг и кэппинг антигенов на клеточной поверхности осуществляются именно с участием цитоскелета и что концентрирование специфических рецепторов в окаймленных ямках плазматической мембраны перед эндоцитозом осуществляется благодаря их взаимодействию с компонентами цитоскелета или с клатрином (разд. 9.4.1).

4. *Липидные микродомены* могут быть термодинамически стабильны как в биологических мембранах, так и в модельных липидных системах [607, 964]. Об этом свидетельствуют многочисленные косвенные данные, хотя четкие доказательства существования таких доменов пока отсутствуют.

Приведенная классификация доменов условна; указанные четыре категории отнюдь не исключают друг друга при рассмотрении способов стабилизации латеральной гетерогенности мембран.

4.5.1. МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ ДОМЕНЫ И БАРЬЕРЫ В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ [560]

Плазматическая мембрана клеток часто бывает разделена на отдельные домены, которые можно даже выделить и охарактеризо-

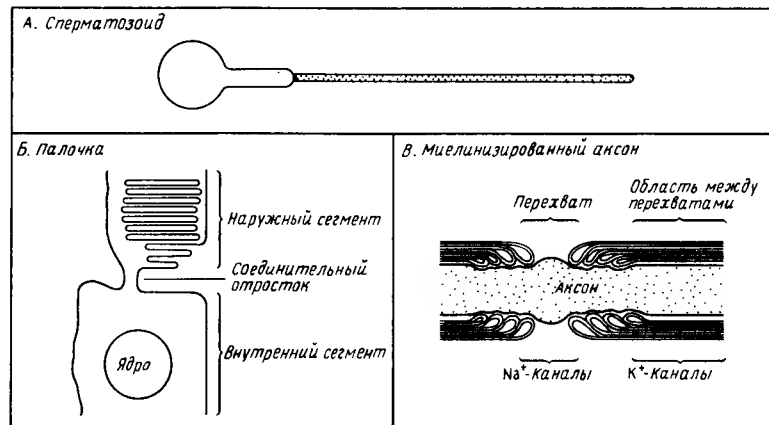


Рис. 4.7. Границы между доменами плазматической мембраны в различных типах клеток [560].

вать. Как правило, эти домены разделены барьерами, которые препятствуют переходу белков и, возможно, липидов из одного домена в другой. В пределах же областей, ограниченных этими барьерами, белки и липиды диффундируют свободно. На рис. 4.7 приведено несколько примеров таких доменов.

1. Апикальная и базолатеральная области мембраны поляризованных эпителиальных клеток имеют разный состав. Показано, например, что ганглиозиды не пересекают границу между этими областями [1369], которая в данном случае представляет собой область плотных контактов между клетками [1495].

2. Плазматическая мембрана спермиев состоит из четко разграниченных участков разного состава, которые можно разделить [300]. Граница между доменами препятствует свободной диффузии мембранных белков [255].

3. Соединительный отросток на палочке сетчатки разделяет ее наружный и внутренний сегменты. Родопсин исходно включается в мембрану внутреннего сегмента, а затем концентрируется в мембране наружного сегмента. Вероятно, в мембране палочки существует диффузионный барьер, поддерживающий эту разность концентраций [1144].

4. Натриевые и калиевые каналы локализованы в разных областях мембраны миелинизированного аксона [1560]. Возможно, такая организация стабилизируется благодаря контактированию мембраны с глиальными или шванновскими клетками, которые образуют миелиновую оболочку вокруг нервного волокна.

Следует отметить, что макроскопическая латеральная гетерогенность может быть характерна и для мембран прокариотических кле-

ток. Например, в мембранах граммотрицательных бактерий имеются области адгезии, в которых, по-видимому, осуществляется контакт между наружной и внутренней мембранами [681]. У пурпурных несерных фотосинтезирующих бактерий (таких, как *R. sphaeroides*) фотосинтетический аппарат локализован в специализированных мембранах, образующихся в результате инвагинаций цитоплазматической мембраны [348].

Экспериментальные исследования в этой области затруднены, поэтому о природе барьеров, разделяющих различные мембранные домены, известно очень мало.

4.5.2. ТИЛАКОИДНЫЕ МЕМБРАНЫ [989, 1042, 1573]

Мембраны тилакоидов в хлоропластах высших растений содержат фотосинтетический аппарат. Эти мембраны собраны в стопки, называемые гранами (рис. 4.8). Соприкасающиеся и не-

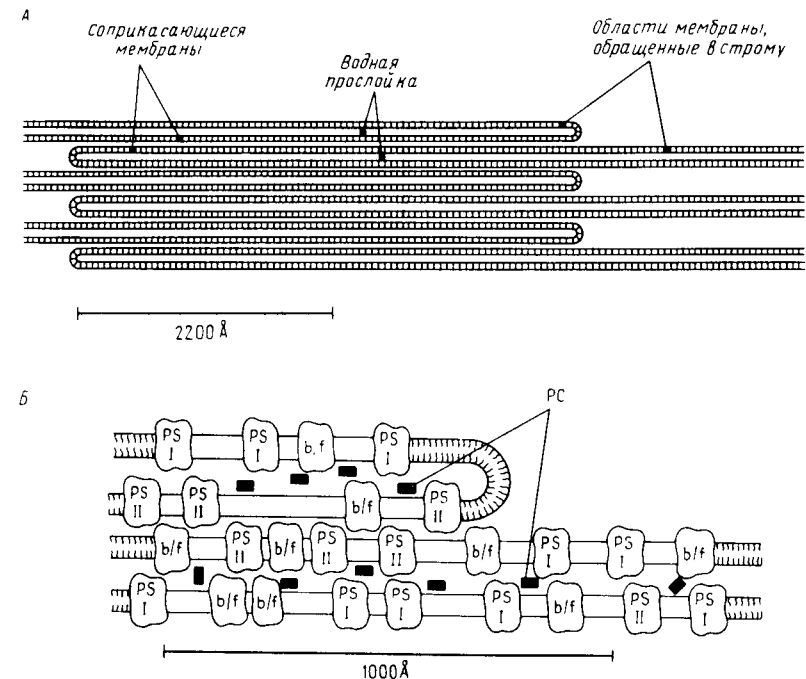


Рис. 4.8. Тилакоидная мембрана [1573]. А. Поперечный разрез грани; показаны также области мембраны, обращенные в строму. Б. Грана в более крупном масштабе; показаны некоторые белковые компоненты в измеренных соотношениях: цитохром *b/f*-комплекс (*b/f*), фотосистема I (PSI), фотосистема II (PSII) и пластоцианин (PC). Рисунок любезно предоставлен д-ром Т. Whitmarsh. См. также рис. 6.5.

щиеся участки мембраны тилакоидов имеют разную морфологию, и их можно разделить. Известно также, что эти две области мембраны имеют разный состав, вероятно стабилизируемый благодаря взаимодействиям между мембранами. Одним из факторов стабилизации мембран в стопках является прямое связывание светособирающих комплексов друг с другом в соприкасающихся мембранах. Важную роль в стабилизации стопок могут играть и электростатические взаимодействия. Детали этих взаимодействий во многом неясны, однако очевидно, что они каким-то образом приводят к функционально значимому латеральному разделению компонентов. Например, две фотосистемы, I и II, которые являются компонентами электронтранспортной цепи, расположены в разных мембранных доменах [965], но связаны биохимически с помощью диффундирующего пластохинона (см. разд. 8.6). Распределение светособирающего комплекса между этими двумя доменами зависит от степени его фосфорилирования.

4.5.3. ВИРУСЫ С ОБОЛОЧКОЙ [1224, 1571]

Вирусы с оболочкой имеют нуклеокапсид, окруженный липидным бислоем. Последний происходит от мембраны клетки-хозяина и образуется при почковании вируса (рис. 4.9). Вирус саркомы Рауса и вирус везикулярного стоматита отпочковываются от плазматической мембраны клетки-хозяина в среду, а другие вирусы высвобождаются во внутренние компартменты клетки, например в аппарат Гольджи или эндоплазматический ретикулум [1240]. Эти вирусы очень полезны как модели для изучения мембранного биогенеза и внутриклеточного мембранного транспорта (гл. 9). Кроме того, они представляют интерес и с точки зрения изучения образования доменов в мембранах. Как показано на рис. 4.9, процесс отпочковывания включает взаимодействие мембраны с нуклеокапсидом и трансмембранными белками шиповидных выростов вируса. Гликопротеины этих выростов внедряются в плазматическую мембрану клетки-хозяина и с помощью своих цитоплазматических доменов взаимодействуют с белками вирусного матрикса, которые связаны с вирусным нуклеокапсидом. В процессе отпочковывания концентрация белков шиповидных вирусов в растущей почке увеличивается, а белки плазматической мембраны клетки-хозяина полностью из нее исключаются. Сформировавшаяся вирусная оболочка содержит только белки шиповидных выростов и совсем не содержит белков клетки-хозяина. Предполагается, что именно взаимодействие между матриксными белками и белками выростов обуславливает латеральное разделение компонентов, происходящее в плазматической мембране. Интересно, что липидный состав вирусной оболочки не совпадает с составом плазматической мембраны клетки-хозяина [1142]. Проще всего объяснить

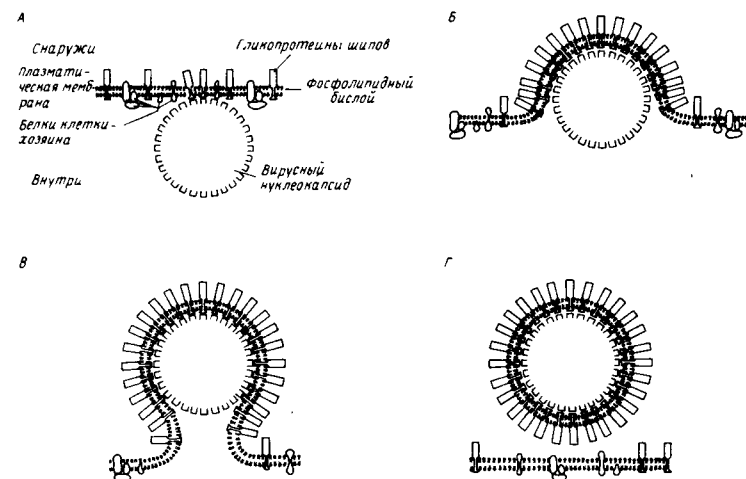


Рис. 4.9. Предполагаемые стадии отпочковывания вируса с оболочкой от плазматической мембраны клетки-хозяина. Взаимодействие белков шиповидных выростов вируса с нуклеокапсидом осуществляется с участием белковых компонентов вирусного матрикса. Матриксные белки, по-видимому, взаимодействуют также непосредственно с фосфолипидным бислоем. В конце процесса белки клетки-хозяина вытесняются из вирусной мембраны.

это предпочтительными взаимодействиями между гликопротеинами шиповидных выростов и определенными липидными компонентами. Эта модельная система окажется полезной и для дальнейших исследований латеральной гетерогенности в мембранах.

4.5.4. ЛИПИДНЫЕ МИКРОДОМЕНЫ [693, 728, 1270]

Как указывалось в гл. 2, при подходящих условиях липиды подвергаются латеральному фазовому разделению с образованием стабильных ламеллярных доменов [693, 607, 702]. Такое разделение можно индуцировать изменением температуры, давления или ионной силы [1270] либо добавлением двухвалентных катионов [607] или белков [702]. Вопрос о том, существуют ли микродомены, подобные наблюдаемым в модельных липидных системах, также и в биологических мембранах, всегда вызывал большой интерес у исследователей. Полученные результаты не являются абсолютно убедительными, поскольку липидные домены не удается выделить и охарактеризовать, как в случае латеральной гетерогенности, рассмотренной выше. Конечно, лучше всего было бы провести фрагментацию мембраны и проиллюстрировать различия в распределении компонентов в выделенных мембранных фракциях [305]. Для об-

наружения латеральной гетерогенности биологических мембран часто используют электронную микроскопию [1329]. О такой гетерогенности можно судить также по данным биофизических методов, если полученный от образца сигнал свидетельствует о наличии различных мембранных популяций, а не одной гомогенной популяции. В качестве примера можно привести измерения коэффициента диффузии флуоресцентных аналогов липидов в протопластах сои [976]. О микрогетерогенности мембран иногда можно судить по поведению ферментов, если ферментативная активность не отвечает усредненному физическому состоянию липидной фазы по всей массе мембраны [639]. Часто эти методы свидетельствуют о наличии в мембране областей с разной текучестью липидов, что указывает на сосуществование фазы геля и жидкокристаллической фазы. Такие выводы были сделаны в ряде исследований, где различные возмущения, вызываемые присутствием *цис*- и *транс*-ненасыщенных жирных кислот, объяснялись их разным распределением между доменами, находящимися в жидкокристаллическом состоянии и в фазе геля [728].

Все эти исследования согласуются с предположением о наличии в биологических мембранах микродоменов, но в большинстве случаев такое объяснение не является единственно возможным или несомненным. Тем не менее идея о существовании липидных микродоменов весьма привлекательна. Ведь благодаря им ферменты в одной и той же мембране могут находиться в разном окружении, и их активность может регулироваться за счет специфичных взаимодействий с липидами или другими белками. Кроме того, на границах между доменами могут проявляться «дефекты» упаковки липидного бислоя. Как полагают, такие границы с резким изменением упаковки липидов в ряде случаев оказывают решающее влияние на функции бислоя [1270]. Исследования модельных липидных систем показали, что при фазовом переходе, когда сосуществуют фаза геля и жидкокристаллическая фаза, пассивный транспорт как гидрофобных, так и гидрофильных веществ ускоряется в несколько раз по сравнению с жидкой фазой (гл. 7). По-видимому, в областях бислоя с дефектами упаковки, где сжимаемость липидов высока, могут образовываться поры [1489]. Благодаря наличию дефектов в пограничных областях бислоя может ускоряться флип-флоп фосфолипидов, возрастая их доступность для фосфолипаз (разд. 6.7.4), а также усиливаться тенденция липидных везикул к слиянию (разд. 9.5.1).

Идея липидных микродоменов в мембранах весьма привлекательна, поскольку она позволяет легко объяснить многие факты, но она все еще нуждается в подтверждении.

4.6. Резюме

Множество фактов свидетельствует о гетерогенности биологических мембран как в продольном, так и в поперечном направлениях. Трансмембранная асимметрия означает, что разные половины бислоя имеют разный состав. Установлено, что интегральные мембранные белки встроены в мембрану асимметрично и эта асимметрия стабильна. Таким образом, к цитоплазматической и наружной поверхностям мембраны обращены разные белковые домены. Получено множество данных (в первую очередь на эритроцитах) о том, что совершенно разным может быть и фосфолипидный состав двух половин бислоя. Как создается эта липидная асимметрия и за счет чего она поддерживается — пока неясно, хотя имеются данные о существовании АТР-зависимых транслоказ, которые ускоряют перенос липидов через бислой. Другими факторами, определяющими асимметрию мембран животных клеток, являются взаимодействия липидов с цитоскелетом и с внеклеточным матриксом на ее поверхности.

Имеются данные и о латеральной гетерогенности биологических мембран. Это могут быть достаточно обширные специализированные участки мембраны, например апикальная или базолатеральная области плазматической мембраны поляризованных эпителиальных клеток. Примером того, как в пределах одной мембраны соседствуют области с разным составом и функциями, могут служить менее протяженные соприкасающиеся и не соприкасающиеся участки тилакоидной мембраны. Все это показывает, что молекулярная организация мембран гораздо сложнее, чем это следует из жидкостно-мозаичной модели, первоначально предложенной Сингером и Николсоном.

ДИНАМИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМ И ЛИПИДНО-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

5.1. Введение

Все биологические структуры по своей природе динамичны, и при рассмотрении их функций необходимо учитывать подвижность компонентов, из которых эти структуры состоят. Это относится к ферментам, полинуклеотидам и, конечно, к мембранам. В жидкостно-мозаичной модели (гл. 1), в центре которой находится представление о подвижности мембранных компонентов, мембрана рассматривается как некое липидное море, в котором свободно плавают глобулярные белки. За последние два десятилетия было опубликовано множество работ, посвященных количественным и качественным аспектам динамики мембранных компонентов. Во многих из них использовались спектральные методы и спектроскопия магнитного резонанса. В результате была создана весьма полезная физическая картина мембран, иллюстрирующая способы перемещения мембранных белков и липидов и их взаимодействия. Кроме того, были разработаны специальные методики, направленные на изучение динамических свойств мембран. Многое в этой области остается неясным, но уже определены основные направления будущих исследований.

Главным побудительным мотивом в изучении мембранной динамики служит ее связь с биологическими функциями мембран. Необходимым условием протекания одних ферментативных процессов является свободная диффузия мембраносвязанных компонентов в плоскости бислоя (гл. 6), другие же процессы могут осуществляться лишь при ограниченной подвижности мембранных компонентов. В предыдущей главе мы рассматривали несколько примеров плазматических мембран, разделенных на большие домены с определенными функциями и составом; эти домены отделены друг от друга барьерами, препятствующими свободной латеральной диффузии мембранных компонентов между доменами. Наличие таких макроскопических доменов существенно для нормального функционирования соответствующих клеток. Между шероховатым и гладким эндоплазматическими ретикулумами, комплексом Гольджи и плазматической мембраной происходит быстрый обмен различными ве-

ществами (гл. 9), и тем не менее их состав и функции различаются. Чтобы понять суть этих и многих других биологических феноменов, необходимо прежде всего выяснить фундаментальные аспекты динамических свойств мембран. Поперечная асимметрия в распределении липидов (гл. 4), а возможно, и пассивная проницаемость бислоев (гл. 7) очевидным образом связаны со скоростью трансмембранного флип-флоп-переноса липидов. Биогенез мембран зависит от скорости обмена липидов между различными мембранами [1044, 301] (гл. 10). Скорость ферментативных реакций, протекающих с участием мембраносвязанных компонентов, зависит от скорости латеральной диффузии компонентов мембран. Наконец, липидно-белковые взаимодействия зависят от скорости, с которой происходит обмен липидами между ближайшим окружением белков и остальным объемом мембраны.

Диапазон движений, происходящих в мембране, весьма широк: от молекулярных колебаний с частотой порядка 10^{-14} с до трансмембранного флип-флоп-переноса липидов, характерное время которого может достигать нескольких суток (гл. 4). На рис. 5.1 в общем виде представлены некоторые из этих процессов, а также указаны временные пределы чувствительности различных биофизических методов. Величины, приведенные на рисунке, различаются на 20 порядков, поэтому термины «быстрый» и «медленный» не могут адекватно характеризовать различные типы движений. Из рисунка видно также, что одни методы позволяют получить статичную картину мембраны, поскольку характерное время соответствующих движений больше, чем время измерений, в то время как дру-

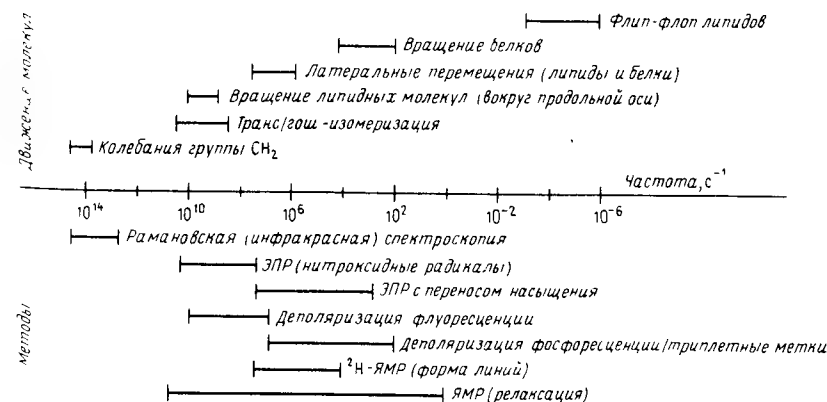


Рис. 5.1. Сравнение характерных частот движений мембранных белков и липидов с диапазоном чувствительности различных спектроскопических методов. Характерные времена равны величинам, обратным указанным частотам. Диапазон чувствительности методов указан приблизительно.

гие методы дают усредненную по времени картину, поскольку время перемещения молекул гораздо меньше, чем время измерения.

Мы рассмотрим два основных типа экспериментов. Первые основаны на использовании внутримембранных зондов для изучения текучести мембраны. Индикаторами физического состояния мембраны, а также характера липидно-белковых взаимодействий могут служить низкомолекулярные ЭПР-метки и флуоресцентные зонды.

Второй тип экспериментов направлен на прямое измерение латеральной диффузии мембранных белков или липидов и вращательной способности белков внутри бислоя. Исследовались также молекулярные взаимодействия в бислое, поскольку они влияют на динамику изучаемых молекул.

5.1.1. НЕКОТОРЫЕ ПРОСТЫЕ МОДЕЛИ ДВИЖЕНИЯ МЕМБРАННЫХ КОМПОНЕНТОВ

На рис. 5.2 представлены некоторые модели, использующиеся для анализа поступательного движения молекул внутри мембранно-

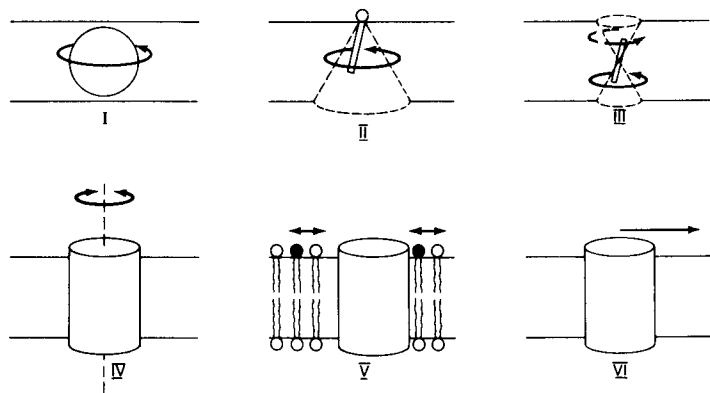


Рис. 5.2. Некоторые модели, использующиеся при анализе вращательного и поступательного движения в мембранах. I. Модель изотропного вращения сферической молекулы в гидрофобной сердцевине мембраны. II. Модель вращения в конусе для молекулы, имеющей форму стержня. Один конец молекулы закреплен на поверхности мембраны. III. Модель вращения в конусе для молекулы, имеющей форму стержня. Молекула вращается внутри гидрофобной сердцевины. IV. Модель вращения трансмембранного белка, имеющего форму цилиндра. V. Латеральное движение липидов, находящихся в основной липидной фазе (слева), и обмен липидов, находящихся в основной фазе и связанных с мембранными белками (справа). VI. Латеральное перемещение трансмембранного белка, имеющего форму цилиндра.

го бислоя. Такие модели необходимы для интерпретации экспериментальных данных с точки зрения молекулярного движения.

1. *Модель изотропного вращения* предполагает, что молекула вращается с одинаковой вероятностью во всех направлениях и выделенная ось вращения отсутствует. Подобное вращение будет совершать сферическая частица в непрерывной жидкой среде. Эта концепция применялась при анализе движения малых растворимых в мембране гидрофобных меток, таких, как ТЕМРО (табл. 5.1). Изотропная трехмерная диффузия сферической частицы рассматривается как случайное блуждание и характеризуется коэффициентом вращательной диффузии $D_{вр}$. Этот параметр определяется как среднеквадратичное угловое отклонение $\langle \theta^2 \rangle$ за время t :

$$D_{вр} = \frac{\langle \theta^2 \rangle}{4t} \quad (5.1)$$

$D_{вр}$ измеряется в с^{-1} . Часто для характеристики вращательной диффузии молекулы используют время вращательной корреляции ($\tau_k = 1/[6D_{вр}]$) или время релаксации ($\phi = 1/[2D_{вр}]$).

2. *Модель вращения в конусе* описывает движение амфифильных меток, например производных жирных кислот. Эти молекулы можно представить в виде жестких стержней, один конец которых закреплен на поверхности мембраны. Их движение ограничивается конусом, который они описывают относительно некой оси, перпендикулярной плоскости мембраны.

3. *Модель вращения в конусе* используется в некоторых работах [757] для описания движения ДФГ (см. табл. 5.1) — гидрофобного флуоресцентного зонда, представляемого в виде жесткого стержня. В данном случае эта модель, постулирующая существование предпочтительной ориентации для ДФГ, является, безусловно, слишком упрощенной, поэтому были предложены альтернативные модели [29].

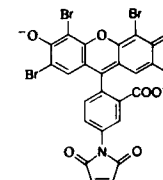
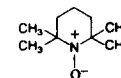
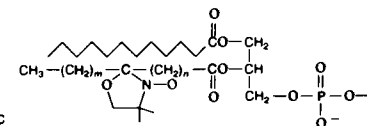
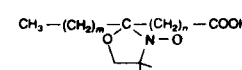
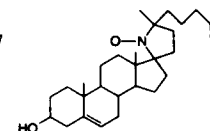
4. В *простейшей модели вращения белков* белковая молекула представляется в виде цилиндра, закрепленного в мембране и способного вращаться только вокруг оси, перпендикулярной плоскости мембраны [211]. Такое вращение анизотропно. Время релаксации, характеризующее это движение, обычно представляется в виде $\phi_{||} = 1/[D_{вр}]$. Знак «||» указывает на то, что вращение происходит параллельно оси цилиндра.

5 и 6. *Поступательное движение липидных и белковых молекул* описывается как двумерная диффузия [366, 1504, 690, 691]. Особый интерес представляет скорость обмена липидов, связанных с мембранными белками и находящихся в основном объеме мембраны. Изотропная двумерная диффузия характеризуется среднеквадратичным перемещением $\langle l^2 \rangle$, происходящим за время t :

$$D_{пост} = \frac{\langle l^2 \rangle}{4t} \quad (5.2)$$

Таблица 5.1. Некоторые метки, используемые для изучения динамики мембран [330]

А. Флуоресцентные зонды	
Дифенилгекса триен (ДФГ)	
(а) транс-Паринаровая кислота	
(б) цис-Паринаровая кислота	
(т,п) Антроилстеарина- вая кислота	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_m-\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$
NBD-фосфатидилэтаноламин (NBD-PE)	
NBD-фосфатидилхолин	
1-ди IC ₁₈ (3)	

Б. Триплетная метка для мембранных белков**Зозинмалеимид****В. Спиновые метки****TEMPO****Спин-меченные
фосфолипиды,
например**
 $\text{R}=(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{ (m,n)PC}$
**Спин-меченные жирные
кислоты, (т,п) жирная
кислота****Спин-меченный холестерол
(пирролидин холестерол)**

В этом случае $D_{\text{пост}}$ измеряется в $\text{см}^2/\text{с}$. Частица с $D_{\text{пост}} = 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ перемещается за 1 с на расстояние 2 мкм.

5.2. Текучесть мембран и применение мембранных зондов [328, 1333, 199]

Для обычной жидкости, какой является, например, вода, текучесть определяется как величина, обратная вязкости — понятному и легко измеряемому физическому параметру. Вязкость характеризует трение, возникающее между соседними слоями жидкости, которые движутся с разными скоростями. Вязкость жидкости можно оценить, измерив скорость, с которой падает мраморный шарик в жидкости. В случае мембран термин «текучесть» обычно носит скорее качественный характер: имеется в виду сопротивление, которое оказывает мембрана различным типам перемещений в ней. Как правило, для измерения текучести наблюдают за движением спиновых или флуоресцентных зондов, включенных в мембрану. Зондами обычно являются небольшие молекулы, сравнимые по размерам с мембранными фосфолипидами. Некоторые из них представлены в табл. 5.1. Теоретические основы использования спектроскопических методов для изучения молекулярных движений описаны в последующих разделах. Поскольку эти методы позволяют измерять как скорость движения, так и сопротивление этому движению, сведения о динамике и молекулярной упорядоченности даются вместе. Укажем некоторые моменты, существенные для количественной интерпретации данных по движению зондов внутри мембран.

1. Липидный бислой не является простой вязкой трехмерной гомогенной жидкостью, а представляет собой жидкую среду с низкой вязкостью, у которой состав и динамические свойства в центральной области сильно отличаются от состава и свойств периферических полярных участков.

2. Вращение зондов изотропно, как это имеет место в случае сферических частиц, не обладающих выделенной осью вращения. Часто зонды внутри мембраны имеют предпочтительную ориентацию и их движения ограничены определенными рамками (см., например, рис. 5.2). Интерпретация экспериментальных данных зависит от модели, используемой для описания молекулярного движения.

3. Локализация зондов в мембране может различаться. Например, зонд может быть связан с белковой молекулой или белковыми агрегатами, располагаться внутри липидного домена, который может находиться в различных физических состояниях.

Для оценки текучести определяют спектроскопические параметры низкомолекулярных зондов. К таким параметрам относятся: 1)

время вращательной корреляции спиновых меток или флуоресцентных зондов; 2) параметр упорядоченности; 3) стационарная анизотропия (или поляризация) флуоресцентных зондов; 4) коэффициент распределения зондов между мембранной и водной фазами. Ясно, что текучесть мембраны, оцененная только по одному параметру, не может служить достаточно полной характеристикой физического состояния мембраны. И все же измерение отдельных параметров весьма полезно, особенно для характеристики изменений физического состояния мембраны, обусловленных, например, изменениями температуры, давления, содержания холестерина, фосфолипидного или ионного состава [1333, 199]. Обычно текучесть, измеряемая с помощью спиновых меток и флуоресцентных зондов, однозначно связана с упаковкой липидов в мембране (по крайней мере в модельных системах). Воздействия, приводящие к уменьшению площади, приходящейся на одну липидную молекулу, такие, как увеличение гидростатического давления, понижение температуры или добавление холестерина к фосфолипидам в жидкокристаллическом состоянии, вызывают уменьшение текучести [1333]. Это согласуется с теорией свободного объема [483, 1333], согласно которой текучесть и плотность связаны между собой обратной зависимостью. Чем более плотная упаковка характерна для мембраны, тем более ограниченным будет движение зонда. Такой подход приемлем при рассмотрении текучести большинства неассоциированных жидкостей.

5.2.1. ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТЕКУЧЕСТИ МЕМБРАН

Обычно биомембраны находятся в жидкокристаллическом состоянии, и, по-видимому, поддержание такого состояния очень важно для их функционирования. При переходе мембраны из жидкокристаллической фазы в фазу геля текучесть уменьшается примерно на два порядка. Структурные и динамические свойства бислоя, находящегося в фазе геля, совершенно несовместимы с организацией и правильным функционированием белковых компонентов в мембране. Впрочем, из этого правила имеются несколько исключений. Это, например, полукристаллические области пурпурных мембран (так называемые бляшки) *H. halobium*, содержащие бактериородопсин (см. разд. 3.5.2).

Возможно, наиболее яркое доказательство того, что текучесть, измеряемая с помощью спиновых меток или флуоресцентных зондов, играет важную физиологическую роль, получено в исследованиях по адаптации различных организмов к внешним экстремальным воздействиям (см. [1333, 252] и разд. 10.5). Подобные явления наблюдаются чаще всего при изучении термического стресса, когда микроорганизмы, растения, пойкилотермные или зимующие живот-

ные подвергаются воздействию низких температур. Адаптация заключается в изменении липидного состава мембран, а именно — в увеличении содержания ненасыщенных липидов или уменьшении средней длины ацильной цепи. Подобные изменения ведут к уменьшению плотности упаковки липидов в мембране и, таким образом, поддерживают текучесть мембраны. Текучесть мембран может быть критичной для одной или более мембранных функций, но каков механизм этого феномена на молекулярном уровне — неизвестно.

5.2.2. ХАРАКТЕР И СКОРОСТЬ ДВИЖЕНИЙ, ИЗМЕРЯЕМЫХ С ПОМОЩЬЮ ^2H -ЯМР, ЭПР И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Необходимо иметь представление о том, что именно измеряется с помощью мембранных зондов; особенно важно знать, каково отношение между временным интервалом, в котором наблюдается изучаемый тип движения, и временной шкалой, характерной для данного метода. Рассмотрим общий случай, который одинаково применим к ЭПР, измерению флуоресценции или ^2H -ЯМР. Все три спектроскопических метода чувствительны к ориентации молекул относительно лабораторной системы координат. Спектр ^2H -ЯМР чувствителен к ориентации связи C—D относительно приложенного поля. Это связано с тем, что градиент локального поля, векторно суммируясь с внешним полем, дает результирующую, которая и улавливается дейтерием. Аналогичная ситуация характерна и для ЭПР. Спектр ЭПР зависит от ориентации нитроксидной связи N—O, которую содержат большинство обычно используемых зондов (табл. 5.1), относительно приложенного магнитного поля. В случае флуоресцентной спектроскопии измеряемая поляризация испускаемого света зависит от ориентации дипольного момента перехода молекулы относительно направления, определяемого используемым поляризатором.

Если молекулы образца ориентированы случайным образом и полностью неподвижны, то каждая субпопуляция, характеризующаяся определенной ориентацией, будет иметь свой уникальный спектр ЭПР или ЯМР, а спектр всего образца будет равен простой сумме этих спектров с учетом их вкладов, определяемых концентрацией соответствующих молекул. Суммарный спектр называется «порошковым» или «твердостекольным» и обычно весьма широк. Такой спектр сильно отличается от спектра образца, в котором молекулы также ориентированы случайным образом, но характерное время их движений гораздо меньше времени измерения. В рассматриваемых нами примерах соответствующие частоты составляют 10^5 с^{-1} для ^2H -ЯМР и 10^8 с^{-1} для ЭПР. Каждая молекула, совершающая быстрое изотропное движение, воспринимает некое сред-

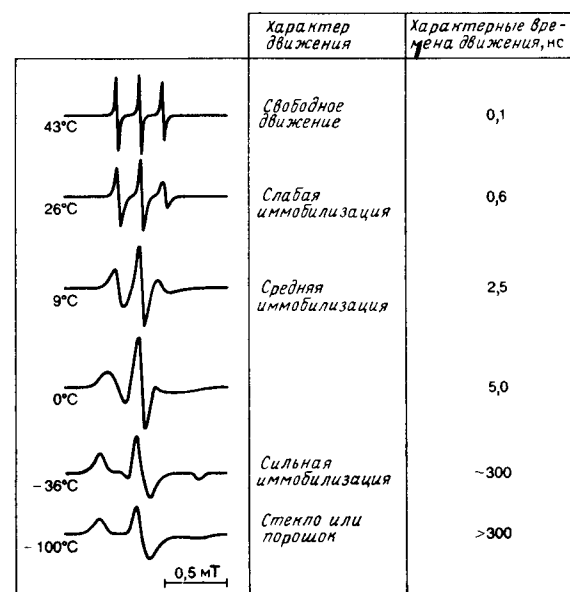


Рис. 5.3. Зависимость ЭПР-спектров нитроксидной спиновой метки от скорости молекулярного вращения. Спектры, представляющие собой первую производную сигнала, получены при разных температурах и, следовательно, при разной вязкости среды [182].

нее магнитное поле, но при этом для всех молекул это среднее поле одинаково, поэтому пики в результирующем спектре очень острые. Примеры ЭПР-спектров приведены на рис. 5.3. Поскольку характерные времена измерения для методов ЭПР и ЯМР различаются, молекула со временем корреляции 10^{-6} с будет казаться неподвижной в первом случае (уширенный спектр) и очень быстро движущейся во втором (узкие пики).

Метод измерения деполаризации флуоресценции состоит в том, что образец облучают поляризованным светом и спустя несколько наносекунд регистрируют испускаемый свет. Если молекулы остаются неподвижными в течение времени между процессами поглощения света и его испускания ($\approx 10^{-8} \text{ с}$), то поляризация испускаемого света будет определяться в основном поляризацией света возбуждающего. Если же молекула совершает быстрое изотропное вращение, то вектор напряженности электрического поля испускаемого света не будет иметь предпочтительной ориентации, поскольку поляризация будет равна нулю. Значения поляризации, находя-

щиеся между этими двумя крайними величинами, соответствуют или медленным движениям, при которых популяция молекул не успевает достичь полностью разупорядоченного состояния за время 10^{-8} с, или быстрым движениям, ограниченным в пространстве и, следовательно, не допускающим полную разупорядоченность (рис. 5.2, модели II, III).

Все три спектроскопических метода используются для нахождения параметра упорядоченности S , который кратко обсуждался в гл. 2:

$$S = 1/2(3\langle \cos^2 \theta \rangle - 1). \quad (5.3)$$

$\langle \cos^2 \theta \rangle$ — это усредненная по времени ориентация молекулы (вектора дипольного момента перехода или связи в молекуле) относительно нормали к плоскости мембраны. Время, за которое происходит усреднение, зависит от метода: 10^{-5} с для ^2H -ЯМР, 10^{-8} с для ЭПР и деполяризации флуоресценции (для такой типичной метки, как ДФГ). В случае ^2H -ЯМР этот параметр чувствителен к медленным движениям, совершающимся за времена порядка 10^{-5} с. Метод ЭПР или деполяризации флуоресценции регистрирует процессы, совершающиеся за время около 10^{-8} с, а информация о более медленных движениях утрачивается.

Данные о динамических свойствах мембран можно получить с помощью всех трех методов и более прямым способом. Так, из данных ЯМР можно найти времена релаксации, которые в свою очередь зависят от характера молекулярных движений. Из спектра ЭПР можно при определенных условиях найти время вращательной корреляции зонда (в предположении, что зонд внутри бислоевой мембраны совершает изотропное вращение). Измеряя зависимость степени деполяризации флуоресценции от времени, можно получить данные о динамическом состоянии зонда, а не только оценить степень ограниченности его движения (разд. 5.2.4).

5.2.3. СПИНОВЫЕ МЕТКИ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕСЯ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ТЕКУЧЕСТИ МЕМБРАН [328, 1303, 182]

ЭПР — это очень ценный метод изучения мембран. Обычно в качестве меток используются стабильные парамагнитные соединения, содержащие нитроксидный радикал (см. табл. 5.1). Неспаренный электрон при наложении сильного магнитного поля ($\sim 0,3$ Т) переходит с одного энергетического уровня на другой под действием микроволнового излучения ($\sim 10^{10}$ Гц). Метод очень чувствителен: обычно спектр регистрируется при концентрации спиновых меток около 10^{-6} М в 50 мкл образца. Спектр ЭПР, как правило, представляют в виде первой производной от спектра поглощения.

В спектре нитроксидного радикала имеются три пика, отвечаю-

щие спин-спиновым взаимодействиям неспаренного электрона и ядра атома азота. И положение спектра (g -фактор), и расщепление, обусловленное спином ядра (параметр A , или сверхтонкое взаимодействие), зависят от ориентации молекулы относительно внешнего поля. Как мы уже говорили в предыдущем разделе, это означает, что характер спектра зависит от характера вращения молекулы. На рис. 5.3 приведены спектры для самых разных случаев — от свободного вращения до полной неподвижности. Для того чтобы найти τ_k в предположении, что вращательное движение молекулы изотропно, можно использовать простое уравнение, в которое входит высота пиков. Этот подход наиболее применим для такой метки, как ТЕМРО.

Спиновые метки — производные жирных кислот или фосфолипидов, — конечно, не вращаются изотропно, и в этом случае для нахождения параметра упорядоченности S из величины расщепления между линиями спектра используется вторая простая формула [328, 1303]. Предположив, что такие метки имеют форму жесткого стержня (рис. 5.2, модель II), можно из величины параметра S оценить максимальное отклонение зонда от нормали к поверхности мембраны.

Многие предположения, которые делаются при нахождении из спектров ЭПР времен вращательной корреляции или параметра S , снижают ценность этого метода для определения количественных характеристик молекул. Эти параметры тем не менее позволяют получить качественное представление о поведении мембраны [328]. Результаты измерения степени упорядоченности спиновых меток, фиксированных в мембране на разной глубине, свидетельствуют об увеличении неупорядоченности в направлении от поверхности мембраны к ее центральной области. Качественно такая же картина получена с помощью ^2H -ЯМР (рис. 2.15) [15]. Во многих исследованиях проводилось сравнение текучести мембран, которую определяли по данным о величинах τ_k и S для спиновых меток, при различных возмущающих воздействиях [328, 603].

5.2.4. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ТЕКУЧЕСТИ МЕМБРАН [1333, 182]

Для измерения вращательной диффузии молекул давно используется метод деполяризации флуоресценции. Вращение некоторых зондов в мембранах часто сравнивают с их вращением в маслах с известной вязкостью, при этом пользуются понятием «микровязкость», которую измеряют (в системе СГС) в пузах. Термин «микровязкость» означает, что зонд «чувствует» величину вязкости только в своем непосредственном окружении, т. е. этот параметр не является макроскопическим. С точки зрения молекулярного дви-

жения подобные измерения не имеют строгого количественного смысла, но, как и в случае со спиновыми метками, полученные результаты позволяют создать ценную качественную картину.

В табл. 5.1 приведены структурные формулы некоторых зондов, используемых при измерении текучести мембран. Чаще всего применяют ДФГ, поскольку он с легкостью накапливается в мембранах, обладает интенсивной флуоресценцией, по-видимому, не связывается с белками и чувствителен к физическому состоянию мембран. Однако временные измерения свидетельствуют о некой гетерогенности неизвестной природы; кроме того, имеются разногласия по поводу ориентации зонда в бислой и характера его подвижности [29].

Дополнение 5.1. Деполяризация испускаемого света и вращение молекул

Рис. 5.4 иллюстрирует принципы, лежащие в основе применения флуоресценции и фосфоресценции для анализа вращения молекул. Молекула, поглотившая фотон, за время 10^{-11} с переходит в возбужденное синглетное состояние S_1 . Термин «синглетное» указывает на то, что спин электрона при поглощении фотона не изменяется. Обычно возвращение в основное, невозбужденное состояние происходит за время $\sim 10^{-8}$ с ($S_1 \rightarrow S_0$). Причинами такого перехода являются столкновение с соседними молекулами, диссипация энергии в виде тепла или испускание фотона (флуоресценция). Характерное время перехода популяции молекул из синглетного возбужденного состояния в основное равно τ_F . Некоторые молекулы с большой вероятностью переходят из синглетного возбужденного состояния в триплетное, и этот переход сопровождается изменением спина электрона. Испускание фотона при переходе молекулы из этого состояния в основное ($T_1 \rightarrow S_0$) называется фосфоресценцией. Время жизни молекулы в триплетном состоянии относительно велико ($> 10^{-3}$ с), что связано с изменением спинового состояния электрона при испускании фотона.

Рассмотрим принцип метода деполяризации. Свет, поляризованный вдоль оси z (рис. 5.4, Б), будет предпочтительно возбуждать молекулы, у которых дипольный момент перехода имеет такую же ориентацию. Вероятность возбуждения пропорциональна $\cos^2 \theta$, где θ — угол между дипольным моментом перехода и вектором напряженности электрического поля. Такая же зависимость от $\cos^2 \theta$ имеет место и для процесса испускания фотона, поэтому молекула, у которой дипольный момент перехода ориентирован вдоль оси z , будет испускать свет с такой же поляризацией.

Испускаемый свет анализируют с помощью поляризаторов,

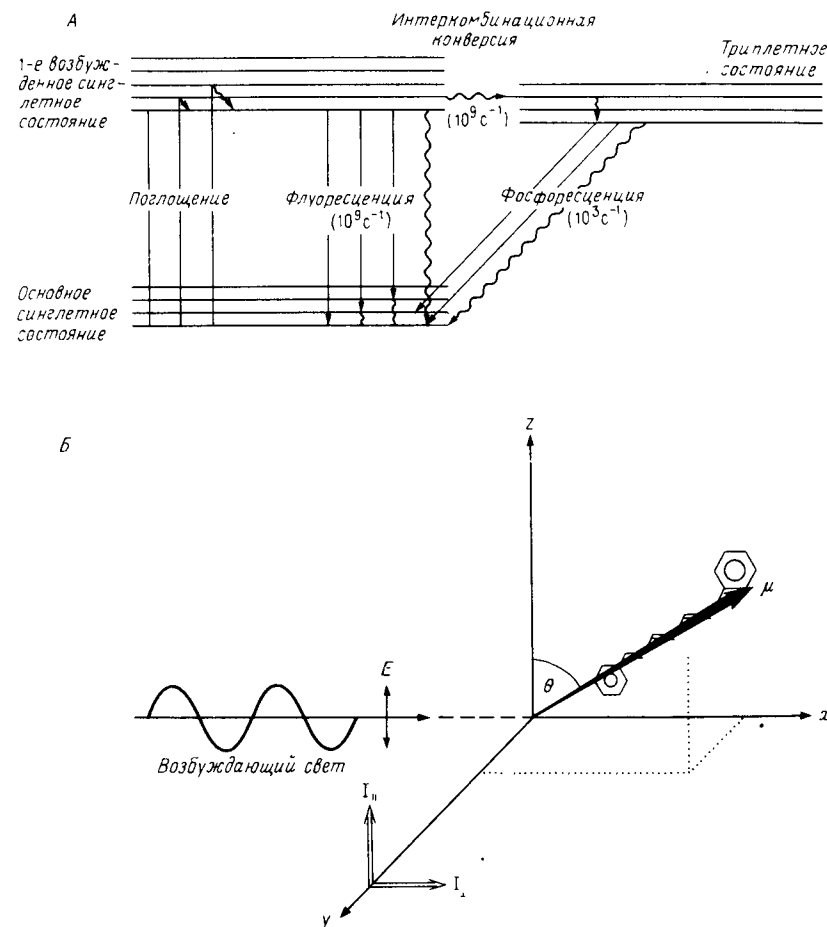


Рис. 5.4. А. Некоторые пути релаксации электронного возбуждения. Волнистые стрелки обозначают пути диссипации энергии без испускания фотона, а обычные стрелки — поглощение или испускание фотона. Указаны также характерные частоты процессов [182]. Б. Геометрическое представление измерения анизотропии флуоресценции или фосфоресценции. Возбуждающий свет поляризован так, что вектор напряженности электрического поля направлен вдоль оси z . Вероятность поглощения света зависит от величины $\cos^2 \theta$, где θ — угол между осью z и вектором дипольного момента перехода в молекуле. Заметим, что этот угол не совпадает с углом θ , фигурирующим в равенстве (5.3).

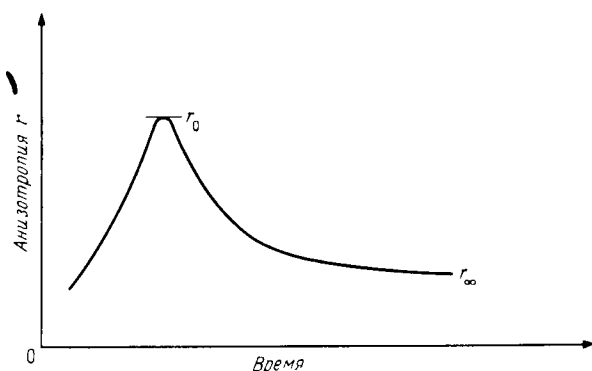


Рис. 5.5. Зависимость анизотропии флуоресценции или фосфоресценции от времени. Для изотропно вращающейся молекулы ($\tau_k \ll \tau_F$) r_∞ стремится к нулю.

определяя интенсивность компоненты, параллельной ($I_{\parallel}$) и перпендикулярной ($I_{\perp}$) направлению поляризации возбуждающего света (см. рис. 5.5). Анизотропия r связана с $I_{\parallel}$ и $I_{\perp}$ следующим образом:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}.$$

Если между моментами поглощения и испускания света молекула не вращается, то $I_{\parallel}$ будет больше, чем $I_{\perp}$, и r будет иметь максимальное значение 0.4. Если же молекулы, находясь в возбужденном состоянии ($\tau_k \ll \tau_F$), совершают интенсивные изотропные вращательные движения, то r будет равно нулю, поскольку в среднем молекулы к моменту испускания света будут ориентированы беспорядочно ($I_{\parallel} = I_{\perp}$). При $\tau_k \cong \tau_F$ величина r будет зависеть от характера движения. При этом τ_k^{-1} и τ_F^{-1} отражают скорости вращения и испускания света.

Для того чтобы разграничить динамические эффекты и эффекты, связанные с ограничениями, налагаемыми на диапазон допустимых движений, определяют временную зависимость анизотропии $r(t)$ света, испускаемого молекулой после возбуждения (рис. 5.5) [627]. Значение r в данный момент времени отражает степень разупорядочивания молекул относительно вектора поляризации за время, прошедшее после поглощения возбуждающего импульса света. Спад $r(t)$ от максимального значения r_0 задается выражением

$$r(t) = r_\infty + r_0 - r_\infty e^{-t/\tau_k}. \quad (5.4)$$

τ_k — время вращательной корреляции, оно определяется скоростью затухания. Если при $t \rightarrow \infty$ все молекулы окажутся беспорядочно

ориентированными, то r в пределе будет равно нулю. Однако если движение молекул ограничено, то их ориентация никогда не будет совершенно случайной. В такой ситуации r_∞ не будет равно нулю, и с помощью этого параметра можно определить степень ограничения, которое налагается на подвижность зонда его окружением. Параметр упорядоченности [627] определяется из этих величин так же, как в случае ЭПР или ЯМР:

$$S = \left(\frac{r_\infty}{r_0} \right)^{1/2}. \quad (5.5)$$

К сожалению, такие кинетические измерения проводятся редко, большинство экспериментов выполнено в стационарном режиме при непрерывном возбуждении и испускании. Значение r , полученное таким способом, носит усредненный характер и определяется как [627]

$$r = r_\infty + (r_0 - r_\infty) \frac{\tau_k}{\tau_k + \tau_F}. \quad (5.6)$$

Рассмотрим следующие три случая.

1. Очень быстрое движение ($\tau_k \ll \tau_F$): $r = r_\infty$, предельному значению.
2. Очень медленное движение или его отсутствие ($\tau_k \gg \tau_F$): $r = r_0$, максимальному значению.
3. Случаи, представляющие практический интерес ($\tau_k \approx \tau_F$): r зависит как от скорости движений (τ_k^{-1}), так и от ограничений, налагаемых на них (r_∞).

Без соответствующей корректировки [1333, 627] определение микровязкости по результатам измерений $\bar{r}$ не будет сводиться к простым динамическим измерениям.

Вязкость бислая весьма высока (1—10 пуаз), поэтому время вращательной корреляции небольших флуоресцентных (ДФГ) и ЭПР-зондов (ТЕМРО) составляет 10^{-8} — 10^{-9} с. В воде, имеющей вязкость 0,01 пуаз, молекулы такого размера вращались бы по крайней мере в 100 раз быстрее. Мембранные белки имеют значительно большие размеры, чем упомянутые метки, и поэтому вращаются гораздо медленнее. Чтобы метки, «пришитые» к этим белкам, были чувствительны к их вращению, время жизни меток в возбужденном состоянии должно составлять порядка 10^{-3} с.

5.3. Вращение мембранных белков [211, 366]

Коэффициент вращательной диффузии мембранного белка, находящегося в плоскости бислая, $D_{\parallel}$, можно найти, представив белко-

вую молекулу в виде цилиндра, который вращается вокруг одной оси (рис. 5.2). Пусть мембрана имеет вязкость η и толщину h , а радиус цилиндра равен a . Тогда

$$D_{\parallel} = \frac{kT}{4\pi a^2 h \eta} \quad (5.7)$$

Часто наряду с ϕ_k применяется время вращательной релаксации $\phi_{\parallel} = 1/[D_{\parallel}]$. Для белковой молекулы радиусом 25 Å, находящейся в мембране толщиной 40 Å и вязкостью 5 пуаз, величина $\phi_{\parallel}$ по оценкам составляет около 35 мкс. С количественной точки зрения это уравнение, описывающее вращение белка в бислое, не вполне строго, но зависимость времени вращательной релаксации от эффективного радиуса вращающейся белковой молекулы сомнений не вызывает. Это оказалось весьма полезным для исследования процессов агрегации белков внутри мембраны [211, 1032, 561]. Методы, применяемые для изучения вращения белков в бислое, должны быть способны регистрировать времена вращения от 10^{-5} до 10^{-3} с. Обычный метод измерения деполяризации флуоресценции в этом случае непригоден, поскольку время жизни молекул в возбужденном состоянии составляет около 10^{-8} с, и в таком временном масштабе молекулы белков представляются неподвижными. Успешно использовались три метода.

1. К исследуемому белку присоединяют зонд, время жизни которого в возбужденном триплетном состоянии достаточно велико (рис. 5.4, А). Если метка жестко связана с белком, то для регистрации вращения белка можно использовать измерение анизотропии фосфоресценции. Для таких измерений оказались пригодными производные эозина (табл. 5.1), поскольку время жизни эозина в триплетном состоянии составляет примерно 2 мс. В основе этого подхода лежат те же принципы, что и в основе метода деполяризации флуоресценции, но используется другая молекулярная модель движения, вызывающего деполяризацию. Эксперимент состоит в определении характерного времени затухания анизотропии фосфоресценции. Если система гетерогенна, могут возникнуть определенные трудности, связанные с количественным анализом экспоненциальной кривой затухания анизотропии. Проблемы возникают и в тех случаях, если метка может локально вращаться на поверхности мембранного белка или если у белковой молекулы имеются гибкие сегменты.

Те же метки могут использоваться и для анализа вращения белков с использованием временной зависимости дихроизма поглощения [496]. В этом случае изменения в ориентации дипольного момента перехода регистрируются по поглощению света, поляризованного параллельно и перпендикулярно оси поляризации начального импульса, используемого для возбуждения молекул.

2. Известны случаи, когда сами молекулы белка содержат группы, переходящие при флеш-фотолизе в долгоживущее возбужденное состояние, параметры которого можно оценить с помощью дихроизма поглощения. В качестве примера можно привести родопсин и бактериородопсин, где используются возбужденное состояние связанного ретиналя и возбужденные состояния, наблюдающиеся при фотолизе комплексов цитохром—СО с использованием цитохром с-оксидазы и цитохрома Р450. Измерения можно проводить *in situ* (например, в митохондриальной мембране) или с очищенным белком, встроенным в фосфолипидные везикулы.

3. С помощью обычной ЭПР-спектроскопии не удается регистрировать вращения, характерная частота которых равна частоте вращения мембранных белков. Однако разработан специальный метод — ЭПР с переносом насыщения [1448], диапазон чувствительности которого очень широк — от 10^{-7} до 10^{-3} с. Этот метод применялся при изучении вращения нескольких мембранных белков с ковалентно пришитыми к ним спиновыми метками [211, 266, 1057]. Недостаток метода состоит в том, что в случае анизотропного молекулярного движения спектры с трудом поддаются интерпретации.

5.3.1. ПРИМЕРЫ ВРАЩЕНИЯ БЕЛКОВ

Внутримембранные белки характеризуются широким спектром времен вращательной релаксации [211, 366]. На одном конце временной шкалы находится родопсин, который, по-видимому, свободно вращается в мембране наружного сегмента палочки сетчатки ($\phi_{\parallel} = 20$ мкс), а на другом — бактериородопсин, который образует в пурпурной мембране упорядоченную кристаллическую решетку (см. гл. 3) и неподвижен. Для нескольких очищенных белков, встроенных в фосфолипидные везикулы, $\phi_{\parallel}$ зависит от концентрации. Это позволяет предположить, что при уменьшении соотношения липид/белок происходит самоагрегация этих белков. Такая картина характерна для бактериородопсина [212], цитохром с-оксидазы [736], белка полосы 3 [1032], Ca^{2+} -АТФазы [1057] и цитохрома Р450 [561]. Возможно, именно с самоагрегацией связана гетерогенность, наблюдаемая, в частности, для белка полосы 3 в тенях эритроцитов и Ca^{2+} -АТФазы из саркоплазматического ретикулула [211, 366, 1057]. Вообще говоря, мембранные белки, по-видимому, вращаются в плоскости мембраны и скорость вращения согласуется с величиной, ожидаемой исходя из простой гидродинамической модели.

Дополнение 5.2. Вращение белка полосы 3 и цитохрома P450: выявление межмолекулярных взаимодействий

Из двух указанных белков — белка полосы 3 ([96, 1032]; разд. 8.3.3) и цитохрома P450 [561] — наибольший интерес представляет первый, поскольку по имеющимся биохимическим данным можно предположить, что этот анионный переносчик связан со спектрино-актиновой сетью цитоскелета. Обнаружение того факта, что значительная часть белковых молекул способна к быстрому вращению, послужило основанием для создания моделей, согласно которым белок полосы 3 иммобилизован не полностью или образует со спектрином временную связь. Однако ситуация осложнялась тем, что при лизисе клеток, необходимом для получения теней эритроцитов, комплекс с цитоскелетом может разрушаться. В intactной клетке белок полосы 3 совершает только медленные вращательные движения с характерным временем 0,1–1 мс [96]. Это больше согласуется с отсутствием поступательного движения белка полосы 3 (см. следующий раздел), хотя физическая причина такого ограничения подвижности не установлена.

Цитохром P450 акцептирует электроны от цитохром P450-редуктазы в электронтранспортной цепи микросом (гл. 6). Многих ученых интересовал вопрос: образуют ли эти молекулы долгоживущий комплекс в мембране или их взаимодействие сводится к простым столкновениям в результате диффузии? При низком соотношении липид/белок цитохром P450 агрегирует [561] и вращение его замедляется. Однако в присутствии стехиометрических количеств редуктазы цитохром P450 в сходных условиях остается мобильным ($\phi_1 = 40$ мкс). Это свидетельствует о взаимодействии двух указанных белков и образовании комплекса между ними со стехиометрией 1:1, которое препятствует агрегации P450.

5.4. Латеральная диффузия липидов и белков в мембранах [211, 691, 366, 690, 1503]

Способность мембранных компонентов к латеральной диффузии — это одно из очевидных условий, принятых в жидкостно-мозаичной модели. Для измерения коэффициента латеральной диффузии применялось несколько методов [211, 366]. Рассмотрим три из них.

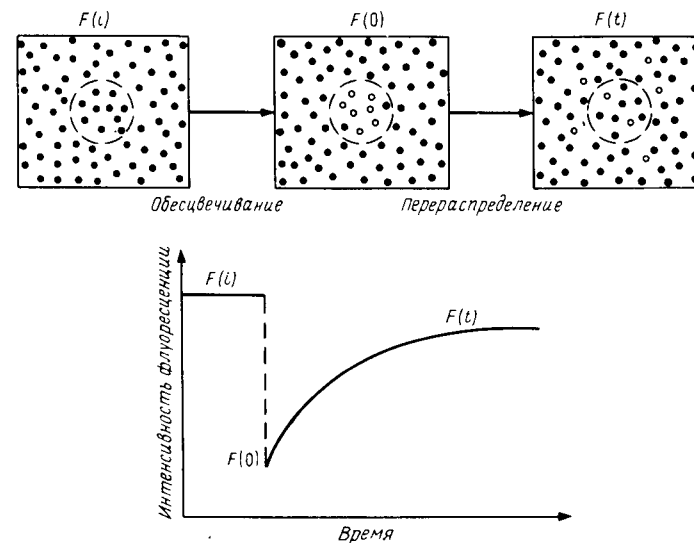


Рис. 5.6. Схематическое представление типичного FRAP-эксперимента [1504]. Измеряют интенсивность флуоресценции $F(i)$, испускаемой флуорофорами, находящимися на небольшом участке мембраны; для возбуждения используют лазерное излучение, не вызывающее фотообесцвечивания. Проводят необратимое фотообесцвечивание значительной части флуорофоров, используя более интенсивное лазерное излучение. Сразу же начинают измерять интенсивность флуоресценции в зависимости от времени.

1. Осуществляют слияние клеток, несущих на своей поверхности различные маркеры, с образованием гетерокарионов. После слияния оценивают скорость перераспределения поверхностных маркеров с помощью флуоресцентной микроскопии и с использованием меченных различными флуоресцентными метками антител против специфических поверхностных антигенов.

2. Осуществляют перераспределение мембранных белков с помощью электрофореза *in situ*. При внесении клеток в электрическое поле белки концентрируются в одной части мембраны, и коэффициент латеральной диффузии определяют по данным о скорости их перераспределения после отключения электрического поля. За перераспределением белков можно наблюдать с помощью электронной микроскопии или флуоресцентных методов [1363, 517].

3. Чаще всего используется метод, основанный на восстановлении способности белков к флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP или FPR). Суть метода представлена на рис. 5.6. С помощью мощного лазерного луча обесцвечивают пятно диаметром ~ 1 мкм на равномерно меченой с помощью флуоресцентной мет-

ки мембране. Далее исследуют кинетику разгорания флуоресценции этого участка и по скорости восстановления флуоресценции прямо оценивают скорость латеральной диффузии флуоресцентных зондов на обесцвеченный участок из областей мембраны, прилегающих к нему. С помощью этого метода можно исследовать амфифильные флуоресцентные зонды, меченые фосфолипиды и белки, несущие флуоресцентные метки. Структурные формулы некоторых наиболее часто используемых зондов приведены в табл. 5.1. Можно ожидать, что применение видеотехники для изучения перераспределения флуоресцентных молекул в мембране расширит рамки применения этого метода [726, 691]. Использование двух первых методов сопровождается значительными нарушениями клеток или мембран. Метод FRAP является более щадящим. Опасения, связанные с возможностью повреждений клеток лазерным лучом, были сняты [366, 690]. Метод можно также применять для исследования модельных мембранных бислоев [1504] и монослоев [1403], а также интактных клеток или фрагментов биомембран. Фокусируя лазерный луч диаметром ~ 1 мкм в разных точках, можно наблюдать за латеральной диффузией мембранных компонентов в различных участках мембраны.

Коэффициенты поступательной диффузии, которые можно определить с помощью этого метода, варьируют от 10^{-7} до 10^{-12} см²/с. Коэффициент диффузии 10^{-12} см²/с в рамках этого подхода соответствует отсутствию движения. Значение $D = 10^{-8}$ см²/с, характерное для липидов в биомембранах, отвечает диффузии на расстояние около 2 мкм за 1 с.

5.4.1. МОДЕЛИ, ОПИСЫВАЮЩИЕ ЛАТЕРАЛЬНУЮ ДИФФУЗИЮ [1503]

Для описания поступательной диффузии мембранных белков часто применяется гидродинамическая модель Саффмана и Дельбрюка [1273]. В этой модели рассматривается диффузия белка в тонком вязком слое; при этом считается, что растворитель является сплошной средой, т. е. молекулы растворителя малы по сравнению с диффундирующими молекулами. В рамках этой модели выполняется следующее соотношение:

$$D_{\text{пост}} = \frac{kT}{4\pi\eta_m h} \left[\ln \frac{\eta_m h}{\eta_b a} - 0,5772 \right], \quad (5.8)$$

где η_m и η_b — вязкости мембранной и водной фаз соответственно, a — радиус белковой молекулы, имеющей форму цилиндра, h — толщина мембраны. Из модели следует, что скорость поступательной диффузии слабо зависит от размера молекулы, что подтверждается полученными к настоящему времени экспериментальными данными (табл. 5.2).

Таблица 5.2. Коэффициенты латеральной диффузии некоторых мембранных липидов и белков [366, 690]

	$D_{\text{транс}} \times 10^8$	Подвижность, %
А. В фосфолипидных везикулах		
Липидные метки (диф, NBD-PE) в фосфолипидных везикулах (см. табл. 5.1)	1—5	100
NBD-Грамицидин	2	100
Гликофорин	2	100
Родопсин	1—3	100
Ацетилхолиновый рецептор	1—2	100
Белок полосы 3	1—2	100
Б. В природных биомембранах		
Липидные метки	0,2—2	100
Рецептор для фактора роста нервов (нейриты)	0,06—0,08	22—64
Рецептор IgE (тучные клетки крысы)	0,03	50—80
Родопсин (диски палочек сетчатки)	0,4	100
Ацетилхолиновый рецептор (миобласты)	<0,0003	—
Белок полосы 3 (тени эритроцитов)	0,004	10
В. В мембранах при нарушении связи с элементами цитоскелета		
Ацетилхолиновый рецептор (вздутия в мембране моторной концевой пластинки)	0,3	100
Белок полосы 3 (эритроцит, дефицитный по спектрину)	0,2	—

Эта гидродинамическая модель не позволяет описывать диффузию липидных зондов, поскольку к ним неприменимо допущение о том, что белок диффундирует в сплошной среде. Для объяснения поведения липидов [658, 1503] применялись различные модели, основанные на концепции свободного объема [483]. В рамках этих моделей диффузия рассматривается как процесс движения молекул в полостях, образующихся вследствие спонтанных флуктуаций, при этом определяющей характеристикой мембран является отношение площади, приходящейся на одну молекулу липида, к минимальной удельной площади, соответствующей максимально плотной упаковке липидов, т. е. плотность упаковки липидов. Как мы уже отмеча-

ли, скорость вращения флуоресцентных зондов зависит от плотности упаковок липидов в мембране [1333]. Применимость этой модели к описанию вращательной или поступательной диффузии липидов строго не доказана, поскольку изначально она была построена для неассоциированных жидкостей, к которым можно отнести далеко не все мембранные липидные структуры. Тем не менее обратная зависимость между скоростью поступательной диффузии липидов и плотностью упаковок липидов в мембранном бислое обычно существует [1503].

Наконец, несколько подходов использовалось для теоретического объяснения влияния мембранных белков на латеральную диффузию белков и липидов в мембране [691]. Дело в том, что белки оказываются на пути диффундирующих молекул и вынуждают их перемещаться только в пространстве, не занятом белками (так называемый эффект архипелага [1285, 1162, 378]). Обычно из-за этого коэффициенты поступательной диффузии в биомембранах оказываются примерно в 10 раз меньше (диффузия происходит медленнее), чем в чисто липидных бислоях [1503, 1363, 522, 378].

5.4.2. ПРИМЕРЫ ЛАТЕРАЛЬНОЙ ДИФФУЗИИ КОМПОНЕНТОВ МЕМБРАН [366, 1504, 690, 1503, 691]

Коэффициенты поступательной диффузии некоторых мембранных липидов и белков приведены в табл. 5.2. Коэффициенты диффузии флуоресцентных меток и аналогов липидов в фосфолипидных мультибислоях или в крупных однослойных везикулах (табл. 5.2) равен 10^{-8} см²/с. При изучении поведения этих же зондов в разнообразных природных мембранах коэффициент диффузии обычно оказывается примерно в 10 раз меньше. Этот феномен, как правило, объясняют присутствием в биомембранах белков, препятствующих латеральной диффузии [1503, 1285, 1162, 522, 378]. Скорость латеральной диффузии фосфолипидов с разными полярными головками различается слабо, однако в реконструированных везикулах ганглиозиды диффундируют медленнее [521]. При переходе мембранного бислоя в состояние геля скорость латеральной диффузии уменьшается более чем на два порядка ($D < 10^{-10}$ см²/с). В жидком бислое модельных мембран и в биомембранах липиды обычно диффундируют свободно, хотя имеются редкие исключения [1599].

Совсем иначе обстоит дело с латеральной диффузией мембранных белков. Исследование поведения нескольких белков в реконструированных везикулах, пока не позволяющее сделать окончательные выводы, тем не менее указывает на то, что коэффициенты поступательной диффузии белков разных размеров очень близки и что белки диффундируют лишь немного медленнее, чем липиды [1503, 691]. Исследованные белки сильно различались по числу

трансмембранных сегментов и по степени ассоциированности, и тем не менее диффундировали с одинаковой скоростью. Модель Саффмана—Дельбрюка предсказывает очень слабую зависимость скорости диффузии от размеров молекул [1273]. В реконструированных везикулах с высоким содержанием белка могут происходить агрегация последнего и латеральное разделение фаз, приводящие к иммобилизации части белка [725].

В биомембранах коэффициенты латеральной диффузии белков обычно в 100—1000 раз меньше, чем в модельных системах с низкой концентрацией белка (т. е. существует эффект разведения). Например, родопсин, по-видимому, свободно диффундирует в биомембране — $D \approx 4 \cdot 10^{-9}$ см²/с. Поскольку мембраны, содержащие родопсин, характеризуются высоким отношением белок/липид (табл. 1.4), ясно, что обычно наблюдаемая медленная диффузия других мембранных белков не может быть обусловлена исключительно присутствием белков в бислое. Есть и еще один интересный факт: восстановление флуоресценции в экспериментах FRAP происходит не полностью и нередко составляет менее 75%. Это означает, что часть изучаемой популяции белков — неподвижна ($D < 10^{-12}$ см²/с).

Вопрос о том, что ограничивает латеральную диффузию мембранных белков, имеет ключевое значение [366, 691]. Маловероятно, что это обусловлено агрегацией мембранных белков, поскольку для объяснения большинства данных потребовалось бы предположить, что образуются слишком крупные агрегаты. Одно из возможных объяснений состоит в том, что мембранные белки малоподвижны, поскольку связаны с внеклеточным матриксом или с цитоскелетом. Обнаружилось, что, оказывая воздействие на внеклеточный матрикс, можно влиять на латеральную диффузию мембранных белков [1052], однако имеются и другие данные, согласно которым эта связь не столь уж важна [366, 690, 1073].

О взаимодействиях между мембранными белками и элементами цитоскелета, ответственных за некоторые из наблюдаемых ограничений латеральной диффузии белков, свидетельствуют разные данные [1503, 367, 1331, 1436]. Белок полосы 3 в мембранах эритроцитов в норме в основном неподвижен, но в клетках с недостатком спектрина его латеральная подвижность возрастает по меньшей мере в 40 раз [1331] (табл. 5.2). При нарушениях цитоскелета в тенях эритроцитов латеральная диффузия белка полосы 3 также возрастает [1472]. Проводились опыты по изучению диффузии ацетилхолиновых рецепторов во вздутых в мембранах, где связь с актином и элементами цитоскелета нарушена. Подвижность белка в таких системах была гораздо выше, чем в клетках с интактным цитоскелетом [1436] (табл. 5.2). Тем не менее гипотезу о том, что низкая подвижность мембранных белков обусловлена их связью с цитоскелетом, нельзя считать бесспорной.

Известен по крайней мере один случай, когда взаимодействия с цитоскелетом не сказываются на латеральной диффузии. G-белок вируса везикулярного стоматита находится в плазматической мембране инфицированных животных клеток и имеет единственный трансмембранный сегмент. Были получены мутантные формы этого белка, у которых цитоплазматический домен отсутствовал [1313]. Ни для одного из мутантов не наблюдалась быстрая латеральная диффузия, которая характерна для мембранных белков, встроенных в искусственные бислои. Эти результаты свидетельствуют о том, что прямые взаимодействия между данным белком и цитоплазматическими белками не приводят к уменьшению латеральной подвижности.

Наконец, следует отметить, что с помощью метода FRAP, используемого в большинстве этих экспериментов, была зарегистрирована диффузия на расстояние от нескольких сотен Å до 1 мкм. Белок может свободно диффундировать внутри небольшого домена, но встречать препятствия на своем пути в присутствии других интегральных или периферических белков, и при использовании метода FRAP будет считаться неподвижным. Кроме того, если бы взаимодействие между мембранными белками и белками цитоскелета было относительно слабым и частота их ассоциации и диссоциации была достаточно высока, белок мог бы перепрыгивать с одного сайта связывания на другой. В результате суммарная скорость латеральной диффузии уменьшилась бы, поскольку белок большую часть времени находился бы в связанном с цитоскелетом состоянии, но скорость движения белка между сайтами связывания была бы высока [692]. Образование кластеров мембранных белков за счет притяжения между ними также приводит к уменьшению латеральной диффузии [1164].

5.5. Липидно-белковые взаимодействия [328, 1360, 925, 828, 330]

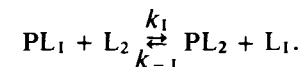
Большинство методов, применяемых для изучения упорядоченности и динамических свойств мембран, используется и для исследования липидно-белковых взаимодействий. Работы по изучению этих взаимодействий были в основном направлены на выяснение влияния мембранных белков на физическое состояние липидов. Рассмотрим типичную мембрану с весовым соотношением липид/белок = 1:1 (табл. 1.4). При средней мол. массе белка 50 кДа молярное соотношение липид/белок составляет ~60:1 при условии, что присутствуют только фосфолипиды. Для сравнения укажем, что соответствующие соотношения для мембраны наружного сегмента палочки сетчатки и саркоплазматического ретикулума состав-

ляют по оценкам 75:1 и 110:1. Если белок представляет собой цилиндр, выступающий за пределы бислоя с обеих сторон примерно на 10 Å, то его радиус должен составлять около 18 Å. Молекула фосфолипида в жидкой мембране занимает площадь ~60 Å², что соответствует радиусу головки ~4,4 Å, и для того, чтобы полностью окружить белок, на каждой стороне бислоя должно находиться около 16 таких молекул липидов. Следовательно, согласно этой модели, в любой момент времени около 50% липидов должно соседствовать с белковыми молекулами. Однако белком занято 35% площади поверхности мембраны, и даже учитывая сугубо приближенный характер этой модели, можно понять, что физические методы регистрации состояния липидов должны учитывать влияние белков на свойства биомембран.

Чтобы выяснить структуру и функции мембран, необходимо прежде всего ответить на следующие вопросы: 1) насколько прочно связаны внутримембранные белки с липидами и какова природа липидного слоя, прилегающего к белку? 2) как далеко простирается влияние мембранных белков на укладку и динамические свойства мембранных липидов? 3) как влияют липиды на структуру и функции внутримембранных белков? 4) как периферические мембранные белки, связанные с поверхностью бислоя, взаимодействуют с липидами и влияют на их поведение?

5.5.1. СВЯЗЫВАНИЕ ЛИПИДОВ С ВНУТРИМЕМБРАННЫМИ БЕЛКАМИ В БИСЛОЕ

Этой теме были посвящены многочисленные исследования [328, 330, 198, 925], в которых использовались разнообразные подходы. По существу во всех этих работах ставилась задача выяснить, есть ли у белков участки, специфически взаимодействующие с определенными липидами, и можно ли считать белково-липидные комплексы долгоживущими, т. е. обладают ли они временем жизни, сравнимым с временем оборота типичного фермента (~10⁻³ с). Такие исследования проводились с помощью ²H-ЯМР, ЭПР и флуоресцентных методов. Чтобы разобраться в полученных результатах, полезно рассмотреть термодинамику простой реакции обмена, где липид одного типа (L₁) вытесняется с места связывания на белке (P) другим липидом (L₂):



Константа равновесия этой реакции равна

$$K = \frac{[PL_2][L_1]}{[P_1][L_2]}.$$

Она является относительной константой связывания липидов L_1 и L_2 с данным(и) участком(ами) белковой молекулы, причем

$$\Delta G^0 = -RT \ln K.$$

Если липиды двух типов присутствуют в мембране в одинаковой концентрации ($[L_1] = [L_2]$) и сродство их к белку одинаково, то $K = 1$. Рассмотрим гипотетический случай, когда L_2 является минорным липидным компонентом и составляет только 5% от общего количества липидов. Тогда

$$[L_1]/[L_2] = 19/1.$$

Предположим, что L_2 предпочтительно связывается с неким участком белковой молекулы, так что в равновесии 90% участков занято L_2 . Тогда

$$[PL_2]/[PL_1] = 9/1.$$

Следовательно, $K = 171$, что соответствует величине $\Delta G^0 = -3,1$ ккал/моль. Столь небольшого различия в свободной энергии связывания оказывается достаточно для существенного смещения распределения липидов, связанных с белком, от равновесного состояния. Это обусловлено тем, что соотношение эффективных концентраций конкурирующих липидов в мембране относительно мало: не превышает 100, а в большинстве случаев гораздо меньше. Другими словами, даже минорные липиды присутствуют в мембране в концентрации, составляющей не менее 1% от концентрации основных липидов, с которыми они конкурируют за места связывания на белках.

Для оценки относительного сродства липидов к специфическим белкам используют два подхода [828]. Они основаны на применении липидных аналогов, встроенных в фосфолипидные везикулы, которые содержат интересующий исследователя белок.

1. Спин-меченные фосфолипиды, соседствующие с мембранными белками, обладают ограниченной подвижностью. Это проявляется в уширении спектра ЭПР (см. рис. 5.3). У тех молекул ЭПР-зонда, которые соседствуют с белком, возможность движения с характерной частотой $\geq 10^8 \text{ с}^{-1}$ существенно ограничена. Спектр ЭПР в этом случае может быть представлен в виде суммы двух компонент: компоненты с узкими спектральными линиями, соответствующей основной липидной фазе, и компоненты, отвечающей липидам с ограниченной подвижностью. Для того чтобы эта последняя была в спектре преобладающей, отношение белок/липид должно быть достаточно высоким. Осложняет картину то, что липиды могут попадать в «ловушки» из белковых агрегатов. Такие липиды тоже обладают ограниченной подвижностью, и им соответствует третья компонента в спектре ЭПР. Для выявления попавших

в ловушку липидов при высоких концентрациях белка можно использовать липидные спиновые зонды, ковалентно связанные с поверхностью белка [328, 330, 297, 550].

2. Спин-меченные и бромированные липидные производные способны тушить флуоресценцию триптофана, входящего в состав мембранных белков. Эффективность тушения зависит от расстояния между липидным производным и остатком триптофана, и присутствие таких липидов в слое, непосредственно прилегающем к белку, приведет к тушению флуоресценции белка. Относительную способность этих липидов связываться с белком в присутствии различных конкурирующих липидов можно исследовать путем измерения интенсивности флуоресценции белка.

Анализ экспериментальных данных [328, 330, 766, 151, 925, 828]

Применимость спин-меченных липидов для определения относительного сродства различных липидов к мембранным белкам определяли с помощью относительно простых моделей с множественным равновесием [766, 151, 328, 828]. Соответствующие методы основаны на определении доли связанной спиновой метки в зависимости от соотношения между общим количеством липидов и белком. В принципе эти методы можно использовать для количественной оценки связывания различных типов меток (например, сильное и слабое связывание), но на практике такие измерения трудно осуществить. Как правило, считается, что все места связывания одинаковы. В одном из вариантов исследуют связывание небольшого количества спин-меченного липида данного типа в присутствии большого количества липида другого типа. При этом снимаются спектры образцов с разным соотношением между липидами и белками. В предположении, что имеется N одинаковых мест связывания, выполняется следующее соотношение [44]:

$$\frac{[\text{Метка}]_{\text{своб}}}{[\text{Метка}]_{\text{связ}}} = \frac{[\text{Общее количество липидов}]/[\text{Белок}]}{NK} - \frac{1}{K}. \quad (5.9)$$

Построив график этой функции, получают прямую, из которой находят N и K . Если метка является спин-меченным производным липида, который служит немеченым растворителем, то величина K должна быть равна 1, что и было подтверждено экспериментально.

Аналогичные допущения можно использовать и при анализе данных по тушению флуоресценции с целью нахождения K [363, 872, 925]. Трудности здесь могут возникнуть из-за гетерогенности мест связывания как по сродству к липидам, так и по способности связанных липидов тушить флуоресценцию триптофана. Однако флуоресцентный метод имеет то преимущество, что при высоких значениях отношения липид/белок агрегация белка создает мень-

шие проблемы, чем при использовании метода ЭПР.

Необходимо помнить, что ни один из методов, используемых для нахождения относительных констант связывания липидов с мембранными белками, не пригоден для определения небольших количеств мест связывания с высоким сродством, поэтому тот факт, что такие места этими методами не обнаружены, вовсе не означает, что они отсутствуют.

Дополнение 5.3. Некоторые белки проявляют избирательность при связывании с фосфолипидами, несущими различные полярные головки

Избирательность связывания с липидами была изучена только для небольшого числа белков, в частности для цитохром с-оксидазы митохондрией, Na^+/K^+ -АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы из саркоплазматического ретикулума и родопсина позвоночных у животных. Как правило, избирательность связывания весьма слаба, при этом максимальное значение K близко к 5. Тем не менее этого достаточно для того, чтобы имелось значительное различие в связывании липидов с разными белками, зависящее от концентрации липидов разных типов, присутствующих в мембране.

1. Одна молекула родопсина (см. рис. 4.1) связывается примерно с 24 липидными молекулами (т. е. $N = 24$), отдавая лишь очень небольшое предпочтение кардиолипину перед фосфатидилхолином [926].

2. Na^+/K^+ -АТФаза из *Squalus acanthus* [152, 295] (разд. 6.5 и 8.4.1) связывается примерно с 60 фосфолипидными молекулами, отдавая предпочтение отрицательно заряженным липидам по сравнению с фосфатидилхолином: для кардиолипина $K = 3,8$, для фосфатидилсерина $K = 1,7$, для фосфатидной кислоты $K = 1,5$. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерол связываются с этим белком с одинаковым сродством. Предпочтение кислым липидам не может быть обусловлено чисто электростатическими эффектами [396]. Какова биохимическая роль такого предпочтения — неизвестно [395].

3. Цитохром с-оксидаза (см. разд. 8.5.1) связывает от 40 до 55 молекул липидов [550, 766, 926, 1171]. Этот фермент отдает предпочтение кардиолипину по сравнению с фосфатидилхолином ($K = 5$). Как правило, при очистке митохондриальной цитохром с-оксидазы она выделяется вместе с кардиолипином [1317]. Высказывалось предположение, что у этого фермента имеется небольшое число мест связывания, обладающих высоким сродством к этому

липиду, и что последний необходим для обеспечения его каталитической активности [1171]. Для выяснения биологической роли предпочтительного связывания кардиолипина необходимо провести дальнейшие исследования. Кроме того, поскольку кардиолипин является димерным фосфолипидом, возникают трудности при анализе данных по конкурентному связыванию [828].

4. Ca^{2+} -АТФаза (см. разд. 6.5 и 8.4.1) привлекла внимание ученых в связи с тем, что, как предполагается, ее ферментативная активность определяется так называемым «липидным кольцом», или «пограничным липидным слоем», непосредственно примыкающим к белку (см. разд. 6.5). Активность Ca^{2+} -АТФазы не зависела от содержания холестерина в реконструированных везикулах, а чистый холестерол тоже не оказывал никакого влияния на ее активность. Это наводило на мысль, что холестерол в указанном пограничном слое отсутствует [1551]. Однако работы по связыванию свидетельствовали об обратном, а дело было в том, что относительная константа связывания холестерола с белком примерно вдвое меньше, чем для фосфатидилхолина [1344, 1342]. Небольшое количество холестерола присутствует и в природных мембранах, содержащих данный фермент. Относительное сродство Ca^{2+} -АТФазы к фосфолипидам почти не зависит от природы полярной головки [363], а также типа ацильных цепей [229], хотя при реконструкции фермента с разными липидами ферментативная активность существенно варьирует [229, 364].

Скорость обмена пограничных липидов со свободными липидами

Термин «пограничный липидный слой» был введен в связи с появлением идеи о существовании стационарного (неподвижного) слоя липида, связанного с поверхностью белка, например цитохромоксидазы. Под «стационарностью» понимается отсутствие обмена липидов за время, сравнимое со временем оборота фермента, т. е. $\sim 10^{-3}$ с, поэтому такой фермент вместе с его непосредственным окружением может рассматриваться как долгоживущий комплекс. Во всех изученных к настоящему времени случаях это условие не выполняется, но термин «пограничный липидный слой» остается полезным описательным термином, если речь идет о ближайшем липидном окружении белка.

Данные ^2H -ЯМР четко показали, что пограничные липиды быстро обмениваются с основной массой липидов в бислое. Спектры ЭПР меченых фосфолипидов свидетельствуют о существовании свободных и связанных липидных компонентов, в то же время аналогичные эксперименты с дейтерированными липидными зондами го-

ворят о том, что организация и динамические свойства липидов в присутствии таких белков, как цитохромоксидаза, практически не изменяются [328, 1360]. Такое расхождение, по-видимому, объясняется различиями в характерных временах измерения двух методов (разд. 5.1). Время обмена пограничных липидов составляет 10^{-6} — 10^{-7} с, поэтому метод ^2H -ЯМР выявляет только один тип липидов, тогда как данные ЭПР свидетельствуют о наличии двух разных липидных популяций.

Если коэффициент латеральной диффузии фосфолипидов в мембранном бислое равен величине, приведенной в табл. 5.2, то среднее время перескока липидной молекулы из одного положения в мембране в соседнее (на расстояние, равное диаметру молекулы, т. е. ~ 10 Å) составляет около 10^{-7} с. Наличие такого быстрого обмена между пограничными и свободными липидами [1265] позволяет предположить, что в известных нам случаях липиды, находящиеся по соседству с белком, и свободные липиды практически равноценны. Необходимо подчеркнуть, что это только грубые оценки, полученные для относительно небольшого числа белков, главным образом производных фосфатидилхолина.

5.5.2. ИЗМЕНЕНИЯ В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ, СВЯЗАННЫЕ С ПРИСУТСТВИЕМ ИНТЕГРАЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ [328, 198]

Результаты большинства исследований липидных бислоев методом ^2H -ЯМР с применением дейтерированных фосфолипидов свидетельствуют о том, что белки оказывают лишь слабое влияние на упорядоченность липидов в бислое и их динамические свойства. Сходные данные были получены методами ^1H -, ^{19}F - и ^{31}P -ЯМР [328, 381, 893]. Имеются сообщения о существовании пограничных липидов в природных мембранах. Эти данные получены методом ^{31}P -ЯМР и предполагают иммобилизацию полярных головок долгоживущими (10^{-3} с) липидно-белковыми комплексами [13]. Однако эти факты нельзя считать окончательно установленными. Так, из данных ЯМР можно сделать следующие общие выводы: 1) скорость обмена между пограничными и свободными липидами весьма велика (10^7 с $^{-1}$); 2) в присутствии белков упорядоченность связанных липидов (т. е. *транс/гаш*-конфигурации ацильных цепей) почти не изменяется; 3) скорость переориентации ацильных цепей в присутствии белков слабо уменьшается (на $\sim 20\%$) в частотном диапазоне 10^9 с $^{-1}$ [960]; 4) соседство с трансмембранными белками не сказывается существенным образом на ориентации и динамических свойствах полярных головок [328]. По данным ЯМР, организация и динамика липидов при контактировании с белками очень слабо, но изменяются. Это связывают с некой «жесткостью» поверхности

белка, контактирующего с липидом, но сами эффекты весьма незначительны.

Влияние мембранных белков на липидные бислои исследовали и многими другими методами. Рассмотрим вкратце некоторые из полученных результатов.

1. Подвижность спин-меченных липидов ограничивается при контактировании их с белками или при захвате липидно-белковыми агрегатами [1128]. В большинстве ЯМР-исследований по релаксации сходные эффекты в том же частотном диапазоне ($> 10^8$ с $^{-1}$) не обнаруживаются. Возможно, эти эффекты обусловлены присутствием объемной нитроксидной спиновой метки. Однако по крайней мере в одном случае и данные ЯМР, и данные ЭПР свидетельствовали об уменьшении подвижности ацильных цепей в этом временном диапазоне при липидно-белковых взаимодействиях [960]. Единого мнения о том, влияет ли белок на подвижность спиновых меток за пределами пограничного липидного слоя, не выработано. О существовании некоего липидного слоя за пределами пограничного слоя свидетельствовали спектроскопические данные [766]; эти данные объяснялись в предположении, что имеется единый липидный слой, подверженный воздействию белков [1166]. В любом случае важно помнить, что методом ЯМР значительные ограничения подвижности обычно не выявляются.

2. Деполяризация флуоресценции мембранных зондов, например ДФГ (табл. 5.1), зависит от присутствия интегральных мембранных белков. По мере встраивания белков в бислой микровязкость последнего возрастает, о чем свидетельствуют поляризационные данные в стационарных условиях. Для согласования экспериментальных данных с представлением о том, что ограничение подвижности испытывают только зонды, соседствующие с белком [1166], использовалось простое моделирование. Однако детальный анализ, включавший измерения анизотропии образцов во времени, в одном случае показал, что а) влияние белка проявляется в основном в увеличении параметра упорядоченности, т. е. в ограничении диапазона движения, и б) данный эффект распространяется за пределы пограничного слоя [1208]. Однако эффекты, наблюдаемые при работе с этими зондами, не обязательно будут характерны для фосфолипидов.

3. Для определения конфигурации ацильной цепи использовался метод инфракрасной спектроскопии с фурье-преобразованием (см. гл. 2). Полученные результаты согласовывались с данными ^2H -ЯМР и свидетельствовали о незначительном изменении упорядоченности ацильной цепи (*транс/гаш*-конфигурации) в присутствии белка [34]. Природа наблюдаемых эффектов зависит от свойств ацильной цепи, поэтому построение какой-то общей модели затруднено [34]. Использование дейтерированных препаратов позволяет избирательно изучать различные липиды; так, было выявлено преиму-

шественное взаимодействие между гликофорином и фосфатидилсерином [968].

4. Для изучения температурного фазового перехода в липидах и влияния мембранных белков на этот переход [949] использовалась дифференциальная сканирующая калориметрия (разд. 2.4.1). Вообще говоря, в присутствии интегральных мембранных белков происходят: а) весьма незначительное уменьшение температуры фазового перехода; б) увеличение ширины интервала перехода и в) уменьшение ΔH перехода [840]. Если в присутствии белка [840] наблюдается только один фазовый переход, то его относят к липидам, которые не подвергаются влиянию белков. Белок как бы изолирует связанные с ними липиды и предотвращает их участие в фазовом переходе. Это приводит к уменьшению молярной энтальпии перехода. Обычно ΔH^0 уменьшается с увеличением содержания белка линейно, что позволяет легко найти число липидных молекул, связанных с одной молекулой белка. Это число варьирует от примерно 20 для бактериородопсина [24] до 685 для белка полосы 3 [213]. Сюда входят не только молекулы пограничных липидов, но и липиды, захваченные белковыми агрегатами, находящиеся в обогащенных белком доменах, а также, возможно, липиды, претерпевшие изменения из-за взаимодействий с углеводными цепями гликопротеинов [213, 891, 1165]. Латеральное разделение фаз и агрегация белков затрудняют использование этого подхода для получения подробной информации о липидно-белковых взаимодействиях. Однако изучение влияния белков на температурные переходы бинарных смесей липидов позволило выявить преимущественные взаимодействия между гликофорином и фосфатидилсеринем [968] и между цитохром с-оксидазой и кардиолипином [1326].

В некоторых случаях были зарегистрированы дополнительные индуцированные белком фазовые переходы в липидах. Возможно, эти липиды содержатся в обогащенных белками доменах, а может быть, наблюдаемый эффект связан с влиянием изолированных белковых молекул белка на липиды, не принадлежащие пограничному слою [840].

Дополнение 5.4. Влияние белков на полиморфизм фосфолипидов

Некоторые белки оказывают сильное влияние на полиморфизм фосфолипидов, стабилизируя ламеллярные или гексагональные формы. Этот факт представляет интерес в связи с гипотезой о том, что инвертированные гексагональные цилиндры (гл. 2) или липидные частицы играют какую-то роль в перемещении липидов через мембранный бислой и в слиянии мембран [265]. В присутствии гид-

рофобного полипептида грамицидина А при соотношении липид/белок, равном 10:1, диолеилфосфатидилхолин переходит из бислойной структуры в гексагональную H_{II} -фазу [749] (разд. 3.7.1). При этом, по-видимому, происходит агрегация грамицидина и последующая дегидратация липидов, стабилизирующая гексагональную фазу. Напротив, гликофорин стабилизирует бислойную конфигурацию диолеилфосфатидилэтаноламина, в то время как обычно этот липид находится в гексагональной H_{II} -фазе [1439]. На полиморфизм кардиолипина влияют положительно заряженные белки, например кардиотоксин, цитохром с и даже поли-L-лизин [74]. В связывании кардиотоксина участвуют как электростатические, так и гидрофобные силы, как и в случае белков, связывающихся с поверхностью мембраны (см. разд. 5.5.3).

Возможная роль упругих деформаций бислоя, обусловленных белками [1269]

Искажения в структуре бислоя, о которых шла речь в предыдущем разделе, в большинстве своем возникают при точном соответствии ацильных цепей липидов форме белковой молекулы, при этом налагаются некоторые ограничения на определенные быстрые движения липидных молекул, соседствующих с белком. Такие искажения распространяются на очень небольшие расстояния, лишь немного выходя за рамки пограничного слоя. Интересно было бы рассмотреть более серьезные возмущения, при которых белки, встраиваясь в бислой, производят более существенные изменения в липидном бислое. Некоторые возмущения такого рода представлены на рис. 5.7. В принципе деформации, индуцируемые в бислое, могут распространяться на значительные расстояния, так реорганизуя липиды и/или белковые компоненты, что система переходит в наиболее стабильное состояние. Было разработано несколько теоретических подходов к исследованию этого вопроса [1269, 1131, 1025], но, к сожалению, экспериментальные данные весьма немногочисленны [1141].

1. Белок в форме клина или белок, проникающий только в один монослой (рис. 5.7, Б), изменяет наклон ацильных цепей липидных молекул в одном или обоих слоях мембраны (в зависимости от того, всю ли мембрану пересекает белок). Это изменение может распространяться на большие расстояния от белка и влиять на взаимодействия липидов с другими мембранными белками. Возникающие при этом напряжения в бислое могут сниматься благодаря реорганизации липидов. Например, липиды с относительно небольшими полярными головками (конусовидными, рис. 2.18) могут группироваться вокруг белковой молекулы. Одним из преимуществ много-

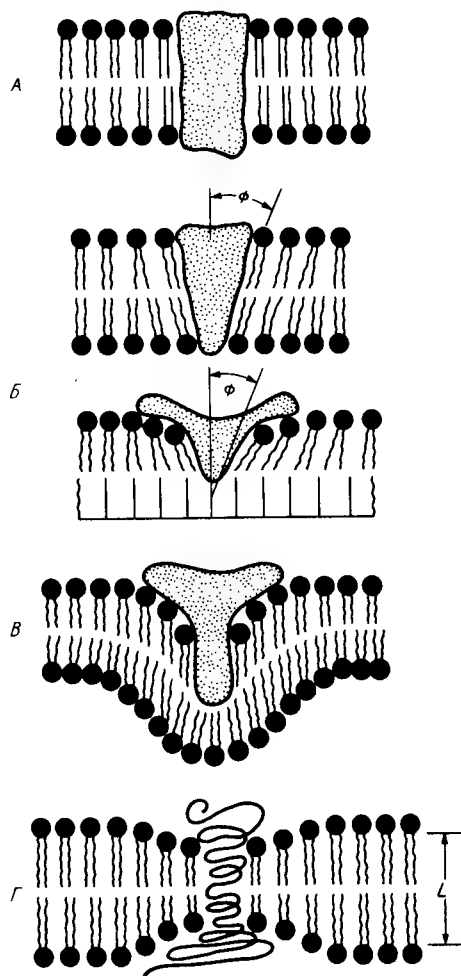


Рис. 5.7. Деформации липидного бислоя при встраивании в него белков [1271]. А. Локальное изменение упорядоченности. Б. Упругая деформация при встраивании клиновидного белка или белка, частично проникающего в мембрану. В. Изменение локальной кривизны бислоя. Г. Уменьшение (увеличение) толщины бислоя, обусловленное несовпадением длины гидрофобных участков липидных молекул и встраиваемого белка.

компонентности мембраны может быть оптимизация упаковки липидов вокруг отдельных мембранных белков, уменьшающая возможные деформации на границе белок—липид.

2. Другой тип деформаций, возникающих при встраивании белка в мембрану, — это латеральные искривления (рис. 5.7, В). Примером такого белка может служить «непрочно» связывающаяся форма цитохрома b_5 (см. разд. 4.3.2).

3. Еще одной причиной деформаций бислоя может служить несоответствие между размером данного гидрофобного участка би-

слоя и толщиной мембраны. Чтобы избежать экспонирования гидрофобных областей в воду, белок или липиды могут частично изменить свою конформацию. Если белок не деформируется, то может произойти следующее: а) или ацильные цепи, или белковая молекула наклоняются относительно нормали к бислою на угол, зависящий от толщины мембраны. Это предположение было в одном случае подвергнуто проверке и не нашло подтверждения [1021]; б) ацильные цепи липидов деформируются; в) в гетерогенной смеси липидов последние реорганизуются таким образом, что молекулы «неправильной» длины оказываются сгруппированными вокруг белка (рис. 5.7, Г).

В принципе подобные упругие деформации могут индуцировать специфические взаимодействия липидов с определенными белками для уменьшения искажений в структуре бислоя путем подгонки формы и размера этих молекул, а не за счет специфических химических взаимодействий. Однако экспериментальные данные на этот счет отсутствуют. Кроме того, простирающиеся на большие расстояния деформации могут влиять на белок-белковые ассоциаты. Экспериментальные подтверждения этому были получены в результате наблюдения с помощью электронной микроскопии за распределением бактериородопсина и родопсина в реконструированных фосфолипидных везикулах при разной толщине мембраны [1131, 1132, 851]. Адаптированный к темноте родопсин действительно агрегировал в результате изменения наклона ацильных цепей липидов при внедрении фермента в бислой, слишком толстый для идеальной упаковки вокруг белка [1132].

5.5.3. ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОСТОВА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И ИХ БОКОВЫХ ЦЕПЕЙ

Проводя ЯМР-исследования твердых образцов, можно получить детальную информацию о динамических свойствах отдельных аминокислотных остатков мембранных белков. Однако при этом необходимы большие количества (100—200 мг) препарата равномерно меченного белка. Наиболее информативным этот метод является в случае небольших белков, когда можно проводить спектроскопические измерения. Возможности этих методов иллюстрируют работы по исследованию белков оболочки нитевидных бактериофагов (например, fd, M13) [842, 621]. При вирусной инфекции эти белки встраиваются в плазматическую мембрану *E. coli* (см. рис. 10.9) с помощью единственной трансмембранной спирали, а во время сборки фага липиды и белки клетки-хозяина исключаются из его оболочки. Малый размер белков оболочки, возможность получения их в больших количествах и легкость выделения создают значительные преимущества при их изучении методом ЯМР, а также другими методами.

Для исследования динамических свойств аминокислотных остатков белка оболочки фага fd (его длина — 50 аминокислот) в реконструированных фосфолипидных бислоях использовались методы ^2H - и ^{15}N -ЯМР. Результаты показали, что полипептидный остов на участке от 5-го до 43-го остатков включительно относительно жесткий, при этом данный сегмент превосходит по длине участок, находящийся внутри липидного бислоя. Несколько остатков на концах полипептида свободны и могут совершать движения с большой амплитудой. Большинство боковых цепей в состоянии совершать такие движения (например, кольца остатков фенилаланина и тирозина могут поворачиваться на 180°), даже когда соответствующие остатки находятся внутри бислоя.

Работы, в которых использовались упомянутые методы, слишком немногочисленны для того, чтобы можно было составить полное представление о характере влияния липидно-белковых взаимодействий на внутреннюю динамику мембранных белков.

5.5.4. СВЯЗЫВАНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ [328, 116, 330]

При изучении липидно-белковых взаимодействий основное внимание уделялось трансмембранным белкам, однако в последнее время проявляется все больший интерес к связыванию с бислоем периферических мембранных белков. Многие такие белки связываются с мембраной главным образом через взаимодействие с интегральными белками. Но существует большая группа разнообразных белков, которые связываются непосредственно с поверхностью липидного бислоя. Некоторые из этих белков, например основной белок миелиновой оболочки [1351, 1413], спектрин [912] и матриксный белок вируса везикулярного стоматита [1581], играют в основном структурную роль. Множество растворимых белков связываются с поверхностью мембраны на непродолжительное время или при специфических условиях. В некоторых случаях связывание белка является необходимым условием проявления его ферментативной активности; такими белками являются, например, протеинкиназа C [586], факторы свертывания крови [818, 945, 773, 1180], пируватоксидаза [536] (гл. 6). Еще одним примером белков, связывающихся с поверхностью бислоя, служат амфифильные пептидные гормоны (см. разд. 3.7.1) и, возможно, сигнальные последовательности [394, 147], которые ответственны за перемещение секретируемых или мембранных белков в нужное место (разд. 10.3.2).

По-видимому, существует два основных, не исключających друг друга типа связывания белков с липидами: 1) связывание осуществляется при участии амфифильной структурной единицы, обычно α -спирали. Эта вторичная структура может индуцироваться и стаби-

лизироваться при взаимодействии с липидами; 2) связывание имеет в основном электростатическую природу и осуществляется при участии положительно заряженного участка белковой молекулы и кислых фосфолипидов. При этом значительную роль могут играть гидрофобные взаимодействия, зависящие от того, насколько глубоко белок проникает в бислой. Во многих случаях для связывания с кислыми фосфолипидами необходим Ca^{2+} , но истинная роль этого двухвалентного катиона (например, образование поперечного мостика с кислыми остатками белка) точно не определена (разд. 6.7.3).

Взаимодействие периферических мембранных белков с фосфолипидами изучали многими методами. Так, за связыванием белков с везикулами можно следить с помощью светорассеяния [818] или путем измерения флуоресценции белков [955], при этом можно определить константы диссоциации [955]. Возмущения в бислое, вызванные связыванием с ним белков, можно выявить по изменению проницаемости везикул [201, 198] или параметров температурного фазового перехода липидов [1180, 188], хотя анализировать эти результаты на молекулярном уровне довольно трудно. Весьма полезным оказалось также изучение монослоев [945, 773], при этом степень проникновения белка в монослой можно оценить по изменению площади поверхности монослоя после внедрения белка.

Для получения детальной информации на молекулярном уровне одним из наиболее ценных методов оказался ЯМР. С помощью ЯМР были детально проанализированы последствия взаимодействия липидного бислоя с основным белком миелиновой оболочки и цитохромом c [1351, 329]. Оба этих белка взаимодействуют с кислыми липидами главным образом электростатически, хотя физиологическая роль такого взаимодействия цитохрома с с липидами неясна. В отличие от трансмембранных белков два указанных периферических белка значительно различаются по взаимодействию с фосфолипидами. Так, при изучении везикул, содержащих димиритоил-фосфатидилглицерол и фосфатидилхолин, обнаружилось, что основной белок миелиновой оболочки специфически взаимодействует с первым из этих липидов [1351]. Исследования методом инфракрасной спектроскопии с фурье-преобразованием показывают, что при связывании с фосфатидилглицеролом белок приобретает высокоупорядоченную вторичную структуру; в основном он образует β -слой, который в отсутствие этого липида не наблюдается [1413]. По данным ^2H -ЯМР белково-липидные взаимодействия приводят к существенному изменению упаковки полярных головок кислых фосфолипидов [1351]. Сходные работы, выполненные на цитохроме c с использованием метода ^2H -ЯМР, показали, что при связывании с этим белком происходят лишь небольшие изменения в упаковке головок фосфатидилсерина; в этих опытах использовались везику-

лы, содержащие также фосфатидилхолин. В обеих системах не наблюдалось никакого латерального разделения фаз и происходил быстрый обмен ($> 10^5 \text{ с}^{-1}$) между свободными и связанными с белками липидами. Однако с другими кислыми фосфолипидами цитохром с взаимодействует по-разному [329]. Например, в везикулах, содержащих кардиолипин и фосфатидилхолин, он вызывает латеральное разделение фаз, а в везикулах, содержащих кардиолипин и фосфатидилэтаноламин, стабилизирует небислойные структуры.

Итак, по-видимому, типы взаимодействия между периферическими мембранными белками и фосфолипидным бислоем весьма разнообразны.

5.6. Резюме

Чтобы до конца установить функции биологических мембран, необходимо изучить динамические свойства их компонентов. Для измерения скорости вращения липидов и белков внутри мембраны и скорости латеральной диффузии этих компонентов в плоскости мембраны были разработаны специальные спектроскопические методы. Они основаны на использовании спиновых или флуоресцентных зондов, которые встраиваются в мембрану или связываются с конкретными белками. Как правило, мембранные липиды могут свободно диффундировать в плоскости мембраны со скоростью, сравнимой со скоростью их диффузии в модельных мембранах. Напротив, латеральное движение интегральных белков в биологических мембранах часто ограничено. Это может быть связано с их ассоциацией с другими мембранными белками или с элементами цитоскелета либо внеклеточного матрикса. Многие белки способны свободно вращаться в плоскости мембраны, но это вращение также может быть затруднено из-за образования белковых агрегатов.

В любой момент времени с белком в биологической мембране соседствует значительная доля липидов. Слой липидов, непосредственно прилегающих к белку, называется пограничным. Эти липиды очень быстро ($\sim 10^7 \text{ с}^{-1}$) обмениваются с основной массой липидов бислоя, и обычно вероятность нахождения тех или иных липидов по соседству с белком или в основной липидной фракции почти одинакова. Правда, для некоторых белков характерна определенная избирательность в связывании с липидами, но для всех известных случаев различие в связывании, измеряемое сродством липидов к пограничному слою, не превышает пяти. И даже такая слабая избирательность может приводить к тому, что липидный состав пограничного слоя будет отличаться от состава основной липидной фазы.

Глава 6

МЕМБРАННАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

6.1. Введение

В предыдущей главе мы рассматривали мембрану как динамическую (в физическом смысле) структуру. Здесь же основной акцент будет сделан на биологической активности мембраны. Биомембрана — это не просто некая пассивная структура, ограничивающая водные компартменты. Уже краткое знакомство с типами ферментов, связанных с мембранами, показывает, насколько разнообразны ассоциированные с мембранами каталитические активности.

1. *Трансмембранные ферменты, катализирующие сопряженные реакции на противоположных сторонах мембраны.* Типичные ферменты этого класса имеют несколько активных центров. Характерными примерами могут служить окислительно-восстановительные ферменты, например фотосинтетические реакционные центры растений и бактерий или цитохром с-оксидаза митохондрий. Расположенные на противоположных сторонах мембраны активные центры этих ферментов сопряжены друг с другом с помощью потока электронов, генерирующего трансмембранный электрический потенциал. К этому классу ферментов могут быть отнесены также многие рецепторы. Связывание лиганда (например, гормона) с доменом, локализованным с наружной стороны клеточной мембраны, приводит к изменениям в цитоплазматическом домене фермента, которые в свою очередь инициируют клеточный ответ. В этом случае через мембрану переносится информация, а не заряды или какие-либо растворенные молекулы. Показано, что некоторые рецепторы являются тирозиновыми протеинкиназами (см. разд. 9.7) и, следовательно, представляют собой мембранные ферменты, обладающие каталитической активностью. Большинство же мембранных рецепторов сами по себе не катализируют никаких химических реакций и не являются в этом смысле ферментами. Рецепторы подробно рассматриваются в гл. 9.

2. *Трансмембранные ферменты, участвующие в транспорте веществ.* Многие мембранные белки участвуют в транспорте молекул через бислой. Активный транспорт может быть сопряжен с гидро-

лизом АТР, как в случае Ca^{++} -АТРазы саркоплазматического ретикула (разд. 6.5; 8.4.1). Движущей силой активного транспорта могут быть также ионные градиенты. Например, транспорт лактозы через плазматическую мембрану *E. coli* с помощью лактозопермеазы сопряжен с поглощением протонов и зависит от трансмембранного градиента электрохимического потенциала (разд. 8.3.2). Белки, участвующие в транспорте веществ, более детально обсуждаются в гл. 8.

3. *Белки, являющиеся компонентами электронтранспортных цепей.* Наиболее типичные ферменты этого класса — компоненты дыхательной цепи митохондрий, заканчивающейся цитохром c-оксидазой; ферменты системы электронного транспорта микросом, включающие цитохром P450 и цитохром b_5 ; элементы фотосинтетической электронтранспортной цепи в тилакоидах. Локализация компонентов электронтранспортных цепей в мембране приводит к увеличению их локальной концентрации, что позволяет значительно ускорить перенос электронов между молекулами. Основной вопрос состоит в том, являются ли компоненты соответствующих электронтранспортных цепей свободно диффундирующими в плоскости мембраны белками или они находятся в мембране в виде более или менее долгоживущих суперкомплексов (разд. 6.6).

4. *Ферменты, способные использовать мембраносвязанные субстраты.* В этот класс могут входить ферменты, участвующие в метаболизме компонентов мембраны: фосфолипидов, гликолипидов, полиизопреноидных соединений и стероидов, а также ферменты, участвующие в процессинге мембранных и секреторных белков. В большинстве случаев эти ферменты являются интегральными мембранными белками, но иногда (примером могут служить фосфолипазы) представляют собой растворимые белки, лишь временно связанные с мембраной (разд. 6.7 и гл. 10). Примерами белков этого типа являются лидерная пептидаза из *E. coli* (разд. 10.3.3) и фосфолипаза C, связанные с мембраной посредством гликозилфосфатидилинозитольного якоря [623].

5. *Ферменты, использующие водорастворимые субстраты.* Многие мембраносвязанные ферменты используют растворимые субстраты. В некоторых случаях фермент локализуется в такой области мембраны, где велика концентрация субстрата. Например, ацетилхолинэстераза, катализирующая гидролиз ацетилхолина, по видимому, фиксируется в постсинаптической мембране с помощью ковалентной сшивки с фосфатидилинозитольным гликолипидом ([1104]; разд. 3.8). Целый ряд ферментов, участвующих в гидролизе крахмала и белков, прикрепляется к мембранам микроворсинок кишечника [1080] с помощью гидрофобных доменов, расположенных в N-концевой части полипептидов. Вероятно, связь этих пищеварительных ферментов с мембраной позволяет создать локально высо-

кую концентрацию растворимых молекул, что способствует их эффективному поглощению клеткой. В качестве примера можно привести два фермента из этой группы: сахараза-изомальтаза [666] и мальтаза-глюкоамилаза [1080].

6. *Ферменты, образующие мембраносвязанный комплекс для облегчения канализации субстрата.* Мембраны могут служить своеобразным организующим каркасом, с которым связываются периферические ферменты с образованием мультиферментного комплекса. Имеются косвенные данные о том, что участвующие в реакциях цикла Кребса ферменты матрикса митохондрий связываются с мембраной таким образом, что продукт одного фермента становится субстратом другого, не выходя за пределы мультиферментного комплекса. Такой механизм мог бы облегчить метаболические превращения. Поскольку ферменты в суперкомплексах связаны друг с другом слабыми связями, с определенностью продемонстрировать их существование довольно трудно. Эти проблемы обсуждаются в разд. 6.7.2.

7. *Ферменты, которые совершают челночные перемещения между цитозолем и мембраной и активность которых модулируется связыванием с мембраной.* Эта группа мембранных ферментов обнаружена недавно. Они способны связываться либо прямо с поверхностью фосфолипидного бислоя, либо со специфическими белковыми рецепторами. Чаще всего эти ферменты активируются при связывании с мембраной, но иногда наблюдается и их инактивация. Типичными примерами ферментов, активирующихся при связывании, являются пируватоксидаза из *E. coli*, протейкиназа C и некоторые ферменты, участвующие в каскаде свертывания крови (разд. 6.7).

В этой главе мы не намеревались дать исчерпывающий обзор механизмов реакций, катализируемых различными мембранными ферментами. Наша задача заключалась в том, чтобы обратить внимание читателя на ряд моментов, которые должны приниматься во внимание при работе с мембранными ферментами. В первую очередь следует отметить ключевую роль липидного окружения мембранных ферментов в проявлении их активности. Этот фактор может очень сильно усложнить интерпретацию кинетических данных и потребовать значительных экспериментальных усилий в реконструкции очищенных интегральных мембранных ферментов с фосфолипидами, с тем чтобы приблизить условия работы фермента к условиям *in vivo* или по крайней мере создать для фермента подходящее окружение.

6.2. Некоторые специфические положения, имеющие отношение к активности мембранных ферментов

Проблема изучения функционирования мембранных ферментов сводится по существу к проблеме гетерогенного катализа. Эти ферменты находятся не в непрерывной гомогенной среде, а локализованы в биомембране, мицелле, везикуле или иной мембранной системе. Мембранные ферменты весьма чувствительны к локальному окружению, которое, вообще говоря, может существенно отличаться от окружения в растворе. Более того, для осуществления каталитической реакции фермент и мембраносвязанный субстрат должны находиться в одной и той же мембране или везикуле, поэтому при анализе кинетических свойств мембранных ферментов часто возникают проблемы, связанные с их пространственным разделением. Рассмотрим некоторые положения, касающиеся кинетических аспектов работы мембранных ферментов как *in situ*, так и в модельных системах.

1. *Пространственное разделение фермента и субстрата.* Фермент и субстрат должны иметь возможность взаимодействовать. Предположим, что мы изучаем очищенный интегральный мембранный фермент в растворе детергента с неполярным липофильным субстратом (например, убихинол: цитохром *c*—оксидоредуктазу [1566]). И фермент, и субстрат солюбилизованы в детергентных мицеллах, но для того, чтобы мог осуществляться катализ, они должны находиться в одних и тех же мицеллах. При избытке детергента увеличивается вероятность того, что фермент и субстрат будут находиться в разных мицеллах, и лимитирующей стадией в этом случае станет диффузия субстрата в ферментно-детергентные мицеллы. При этом скорость работы фермента зависит от поверхностной концентрации субстрата в мицелле, а не от объемной концентрации (для примера см. рис. 6.7). При работе с очень гидрофобными субстратами часто возникает другая проблема. Такие субстраты могут не до конца солюбилизоваться в мицеллах или мембранных везикулах, часть их коагулирует с образованием комков или микроскопических кристаллов, в которые фермент не проникает. Небольшое число ферментов может работать в вывернутых мицеллах, когда содержащие воду структуры диспергированы в органическом растворителе [631], но это скорее исключение, чем правило.

Иные проблемы при измерении активности мембранных ферментов возникают, когда либо фермент, либо субстрат находится как в мембраносвязанной, так и в растворенной формах. Примерами такого рода служат «поверхностные» ферменты — липазы или факторы свертывания крови (разд. 6.7.3 и 6.7.4). Для анализа кинетики

таких систем необходимо знать соотношение между формами фермента в данных экспериментальных условиях и каталитические активности каждой из форм. Во всех этих случаях смысл величин максимальной скорости и константы Михаэлиса может быть совершенно иным, чем для ферментов, активность которых измеряется в гомогенной среде, что сильно осложняет интерпретацию этих параметров [164].

2. *Гистерезис и гетерогенность.* Мембранные ферменты обладают и другими особенностями, затрудняющими интерпретацию кинетических данных. Эти особенности связаны с солюбилизацией. Каталитическая активность мембранных ферментов часто очень сильно зависит от используемого детергента или фосфолипида. Обычно активность мембранных ферментов измеряют в смеси, содержащей детергент и экзогенно добавленный фосфолипид. Кроме того, ферментный препарат нередко содержит соочищаемые с ним эндогенные липиды. В таких условиях физическое состояние фермента, в частности степень его агрегации, оказывается весьма неопределенным и скорее всего гетерогенным. Часто в одной и той же среде, компоненты которой смешивались в разной последовательности, получают совершенно разные ферментативные активности. Такая зависимость от предыстории препарата является собой пример гистерезиса и весьма типична для мембранных ферментов. По существу фермент «застревает» в метастабильном состоянии и не может приобрести наиболее стабильную «рабочую конформацию». Например, простое смешивание солюбилизованного мембранного белка с фосфолипидными везикулами скорее всего не приведет к встраиванию белка в липосомы. Для достижения успешной реконструкции разработаны специальные процедуры, позволяющие избежать перехода системы в нежелательное метастабильное состояние (разд. 6.3). В качестве примера фермента, образующего крупные агрегаты, можно привести бактопептокиназу, очень гидрофобный белок из *Staphylococcus aureus* [504]. Его активность не зависит от степени агрегации, что встречается далеко не всегда (см., например, [379]).

Явление гистерезиса сильно зависит от типа фосфолипида, поэтому данные по специфичности липидов в отношении активности отдельных мембранных ферментов часто оказываются весьма ненадежными [503].

3. *Ферменты в везикулах.* Часто в исследованиях используют мембранные ферменты, встроенные в бислой замкнутых везикул. Это могут быть либо ферменты *in situ*, содержащиеся в изолированных природных мембранах, либо очищенные ферменты, встроенные в липосомы. В таких экспериментах возникают свои проблемы. Наиболее очевидная из них связана с тем, что активный центр фермента может находиться внутри везикулы и, следовательно,

быть изолированным от растворимого в воде субстрата. С этим связана проблема так называемой скрытой ферментативной активности, выявляемой только после того, как везикулы по тем или иным причинам станут проницаемыми или разрушатся. Это явление часто используют для определения ориентации мембранного фермента в везикуле. Доля скрытой активности прямо соответствует доле фермента, активный центр которого локализован внутри везикулы. При этом можно использовать только такие субстраты, которые не способны проникать через мембрану (например, цитохром *c* в случае цитохром *c*-оксидазы).

Проблемы другого рода возникают при измерении активности трансмембранных ферментов, которые катализируют реакции, сопровождающиеся транспортом веществ или зарядов через бислой. Примерами таких ферментов могут служить цитохром *c*-оксидаза (разд. 8.5.1), катализирующая перенос электронов через мембрану и транспорт протонов в противоположном направлении, а также разнообразные АТР-зависимые ионные насосы, например Ca^{2+} -АТРазы (см. разд. 8.4.1). При встраивании в везикулы преимущественно в одной ориентации относительно внутренней и наружной сторон везикулы такие ферменты создают трансмембранный градиент концентрации веществ или электрический потенциал. Именно в этом и состоит их физиологическая функция. В везикулах с маленьким внутренним объемом, однако, этот градиент будет создаваться очень быстро, что приведет к фактическому уменьшению числа оборотов фермента, если не будут приняты соответствующие меры. Это уменьшение связано с тем, что химическая работа, совершаемая при переносе молекулы, иона или электрона против существующего градиента, увеличивается с увеличением этого градиента. При градиенте выше определенного уровня фермент вообще перестает работать. Система, в которой происходит такое уменьшение активности, называется «сопряженной», а сама эта активность является мерой того, насколько целостны везикулы и в какой мере предотвращена утечка ионов или молекул в направлении градиента, созданного с помощью фермента. Степень сопряжения можно оценить, измеряя активность фермента в условиях, когда градиенту не дают образовываться. Например, градиент электрического потенциала, создаваемый на мембране везикулы цитохром *c*-оксидазой, можно разрушить, добавив в среду ионофор (разд. 7.5.2), увеличивающий ионную (обычно H^+ или K^+) проницаемость бислоя [191, 903]. При этом необходимо, чтобы внутри везикулы была высокая концентрация буфера, поскольку в противном случае утилизация протонов внутри везикулы с образованием воды приведет к быстрому и сильному защелачиванию внутренней среды, что может повлиять на ферментативную активность.

Работа некоторых ионных каналов (см. гл. 8) и ферментов [472]

прямо регулируется трансмембранным потенциалом. С помощью флуоресцентных и спиновых меток показано также, что при наличии разности потенциалов может существенно увеличиваться микровязкость бислоя [1087]. Это тоже сказывается на активности ферментов. И наконец, утверждается, что трансмембранный потенциал влияет на степень агрегации некоторых мембранных белков [524, 361], но физиологическая роль этого явления неизвестна. Все эти эффекты наблюдаются только на замкнутых везикулах.

4. *Влияние поверхностного потенциала.* Большинство биомембран содержат значительное количество отрицательно заряженных фосфолипидов, а следовательно, несут суммарный отрицательный заряд. С этим отрицательным зарядом, распределенным по поверхности мембраны, связан поверхностный электрический потенциал (см. разд. 7.3.3). Он вызывает уменьшение концентрации отрицательно заряженных ионов в прилегающем к мембране слое по сравнению со средней объемной концентрацией и увеличение локальной концентрации положительно заряженных ионов вблизи поверхности мембраны. Поверхностный потенциал, изменяя локальную концентрацию заряженных субстратов и протонов, может довольно существенным образом сказаться на поведении ферментов, активный центр которых локализован у поверхности мембраны. При физиологической ионной силе этот эффект будет проявляться главным образом в области, непосредственно примыкающей к заряженной поверхности мембраны, но тем не менее может оказаться весьма существенным. Влияние поверхностного потенциала проявляется в изменении измеряемой величины K_M для заряженных субстратов или в сдвиге рН-зависимости активности фермента, поскольку локальная концентрация любого заряженного вещества будет либо выше, либо ниже, чем концентрация в объеме. Поэтому кинетические характеристики мембранного фермента, встроенного в везикулы, которые получены из разных фосфолипидов и имеют разную поверхностную плотность заряда, могут различаться, и в свою очередь отличаться от свойств фермента, находящегося в нейтральных detergentных мицеллах.

Подобные эффекты наблюдались для некоторых митохондриальных и микросомных ферментов — как *in situ*, так и встроенных в фосфолипидные везикулы, например для арилсульфатазы С [932, 1056], использующей отрицательно заряженный субстрат, или для моноаминоксидазы [1056], катализирующей превращения катионного субстрата. Изменение липидного окружения β -гидроксипутиратдегидрогеназы также влияет на величины K_M для NADH. Полагают, что это влияние обусловлено изменением плотности поверхностного заряда [221, 222].

В заключение отметим, что в литературе активно обсуждалась роль поверхностного заряда тилакоидных мембран как фактора, ре-

гулирующего латеральное распределение мембранных белков и взаимодействие между мембранами ([68]; см. также разд. 4.5.2). В этом случае, однако, поверхностный заряд мембраны определяется главным образом белковыми компонентами, а не липидами. Как бы то ни было, ясно, что учет поверхностного потенциала совершенно необходим при анализе работы многих мембранных ферментов *in vivo*, а также при реконструировании систем из очищенных компонентов, моделирующих природные структуры.

6.3. Реконструкция мембранных ферментов [405, 282, 847, 191, 694]

После того как мембранный фермент очищен, для изучения его каталитической активности желательно, а часто и необходимо реконструировать его с фосфолипидами. Кинетические характеристики многих ферментов *in situ* и после очистки и реконструкции одинаковы. Несмотря на то что свойства фермента в искусственных системах могут изменяться, изучение очищенных и реконструированных ферментов дает большие преимущества. В частности, а такой системе не протекают различные конкурирующие реакции, присущие биомембранам. Удастся устранить и другие осложняющие исследование проблемы. Использование реконструированной системы позволяет не только охарактеризовать изолированную систему, но и определить минимальное число компонентов, необходимых для проявления тех или иных биохимических активностей. С помощью реконструкции в фосфолипидные везикулы, например, было показано [938], что за поглощение лактозы клетками *E. coli* ответствен только один белок, лактозопермеаза (разд. 8.3.2). Аналогичным способом было однозначно определено минимальное число белковых компонентов, необходимых для реконструкции дыхательной цепи *E. coli* [770] и системы аденилатциклазного гормонального ответа ([942]; см. также гл. 9).

Для встраивания солюбилизованных в детергенте очищенных мембранных компонентов в модельные мембранные системы разработано несколько методов. Чаще всего ферменты встраиваются в однослойные фосфолипидные везикулы. Характеристики же белков, активно или пассивно увеличивающих ионную проводимость мембраны, часто определяют после их встраивания в плоский бислой ([282, 1010]; см. также разд. 2.5.3 и 8.1.4). Плоские мембраны удобны для электрических измерений, позволяющих определить величину ионной проводимости и прочие производные характеристики, например зависимость доли открытых каналов от приложенного электрического напряжения. В таких системах, однако, трудно или даже невозможно определить биохимические характеристики

белка, в частности его каталитические активности, отличные от ионной проницаемости.

Дополнение 6.1. Встраивание мембранных ферментов в липидные везикулы

Для встраивания мембранного белка в липидную везикулу прежде всего необходимо избавиться от находящегося в препарате белка детергента, который, если он присутствует в значительных количествах, дестабилизирует фосфолипидный бислой. Обычно детергент удаляют уже из смеси белка с фосфолипидом, но в некоторых случаях белок очищают от детергента до начала реконструкции. Для удаления детергента используют гель-фильтрацию, диализ или адсорбцию на поверхности шариков из полистирола (BioBeads SM-2). Последний способ применяют в первую очередь для удаления тритона X-100. Все перечисленные методы довольно эффективны, однако следует иметь в виду, что даже после самых интенсивных обработок в системе обычно всегда остается то или иное количество связанного детергента [20].

Методы реконструкции [191] можно разделить на две группы.

I. Процедуры, при которых белок предварительно очищают от детергента, а затем проводят реконструкцию.

II. Процедуры, в которых белки и фосфолипиды смешивают в присутствии детергента, а затем удаляют детергент до образования протеолипосом. Единственное ограничение здесь состоит в следующем: выбранный фосфолипид должен быть способен к формированию стабильных бислоев. Нельзя, например, использовать ненасыщенные фосфатидилэтаноламины. Весьма удобен суммарный фосфолипид из соевых бобов, поскольку он относительно недорог, легкодоступен и применим во многих случаях [191].

I. Реконструкция без избытка детергента [694]

Условия включения мембранных белков в предварительно сформированные фосфолипидные везикулы часто совпадают с условиями, способствующими слиянию фосфолипидных везикул (см. разд. 9.5). В основе обоих процессов лежат определенные нарушения бислойной структуры, или образование «дефектов», которые могли бы облегчить как встраивание белка, так и слияние везикул. Механизмы этих процессов изучены мало. Возможной трудностью в применении этих методов является агрегация белка.

1. *Инкубация белка с заранее полученными везикулами.* Этот способ применим далеко не всегда и используется для реконструкции не пронизывающих бислой белков с ограниченной гидрофобной

поверхностью, например цитохрома b_5 и β -гидроксибутиратдегидрогеназы (разд. 6.5). Конформация встроенного таким образом белка, однако, отличается от нативной (см. разд. 4.2.2).

2. **Реконструкция с участием амфифильных катализаторов.** В ряде работ было показано, что добавление в белково-фосфолипидную смесь амфифильных веществ в низких концентрациях облегчает встраивание в везикулы таких мембранных ферментов, как бактериородопсин или цитохром с-оксидаза. В качестве амфифильных веществ использовали холестерол [1311], короткоцепочечные фосфатидилхолины [323] и жирные кислоты [1310]. Данный способ хорош тем, что в нем не используются какие-либо грубые процедуры, в том числе обработка избытком детергентов, однако пока он мало распространен.

3. **Замораживание—оттаивание/обработка ультразвуком.** В некоторых случаях [405, 191] с успехом используется метод замораживания—оттаивания смеси с последующей обработкой ультразвуком. Эта методика, однако, применяется нечасто из-за опасности денатурации белка. Иногда для облегчения реконструкции используют простую обработку ультразвуком. Вероятнее всего, белок вначале включается в маленькие везикулы, обладающие высокой кривизной. Замораживание—оттаивание, возможно, нужно для слияния мелких протеолипосом в более крупные и более однородные по размерам.

II. Реконструкция с использованием детергентов

В настоящее время для реконструкции гораздо чаще используют методики, состоящие в солюбилизации смеси белка и фосфолипида детергентом и последующем удалении детергента. После его удаления белок и фосфолипид спонтанно формируют однослойные везикулы, вполне пригодные для энзимологических исследований. Обычно выбирают детергенты с высокой критической концентрацией мицеллообразования и малыми размерами мицелл, с тем чтобы их можно было легко удалить диализом или гель-фильтрацией. Чаще всего используют холат натрия и октилглюкозид. Распределение полученных везикул по размерам определяется соотношением детергент : фосфолипид, а также способом и скоростью удаления детергента [23, 1475]. Обычно используют диализ как более медленный способ. В качестве примеров можно привести встраивание цитохрома с-оксидазы [191] и Na^+/K^+ -АТФазы [39].

С помощью такой методики можно ввести в везикулы отличные от фосфолипидов вещества, например холестерол или убихинон. В ряде случаев возникает необходимость в достаточно быстром удалении детергента, особенно если белок нестабилен при его избытке. Тогда применяют гель-фильтрационную хроматографию, тоже позволяющую эффективно отделить белково-липидные везикулы от де-

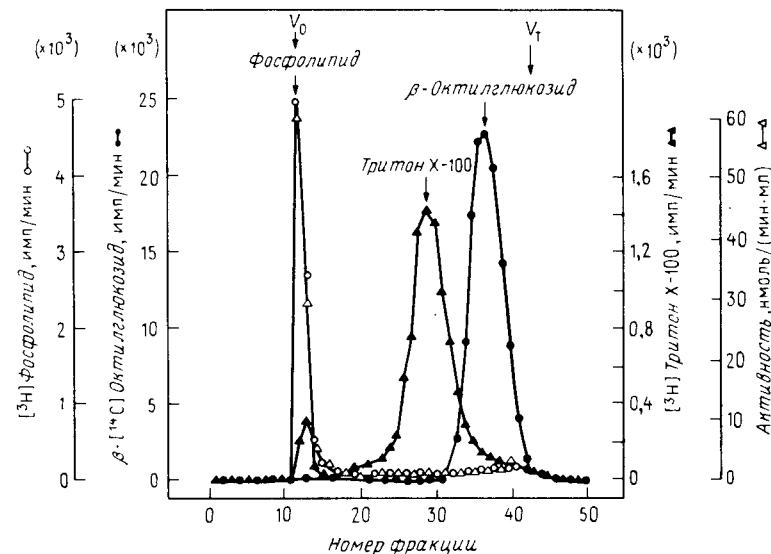


Рис. 6.1. Встраивание фермента глицерол-3-фосфатацилтрансферазы в фосфолипидные везикулы методом гель-фильтрации на сепарозе G-50 [54]. Образец содержал смесь фосфолипидов, β -октилглюкозид, третон X-100 и очищенный белок. На хроматографической колонке удается отделить белково-фосфолипидные везикулы от мицелл третона X-100 и β -октилглюкозида, которые также элюируются раздельно.

тергента (например, при реконструкции глицеро-3-фосфатацилтрансферазы [544] и фосфатидилинозитолсинтазы [431]). На рис. 6.1 показан профиль элюции с такой колонки.

Еще более быстрым является метод разведения, когда белково-липидно-детергентную смесь разводят до концентрации детергента много меньшей, чем критическая концентрация мицеллообразования. При этом спонтанно образуются белково-фосфолипидные везикулы, которые можно отделить от детергента центрифугированием [938].

Обычно используемый для очистки мембранных ферментов третон X-100 весьма неудобен при реконструкции, поскольку его трудно удалить из системы. Для удаления третона применяют шарики из полистирола, и одна из проблем — потеря белка из-за его сорбции на поверхности шариков [20]. В качестве примера белка, реконструируемого этим методом, можно привести натриевый канал [416].

И наконец, для реконструкции применяли метод, основанный на диспергировании смеси холестерол—фосфолипид—белок в диэтиловом эфире и последующем испарении обращенной фазы [240].

Однако маловероятно, что многие белки выдержат такую процедуру.

6.3.1. НЕКОТОРЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ БЕЛКОВО-ФОСФОЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ (ПРОТЕОЛИПОСОМ)

В результате применения всех методов, разработанных для реконструкции мембранных белков, образуются однослойные везикулы. Характеристики некоторых из них детально изучены. Это, в частности, протеолипосомы, содержащие цитохром *c*-оксидазу [191, 903], Na^+/K^+ -АТФазу [39], цитохром *b*₅ [219, 547] и гликофорин [993]. Особый интерес представляют: 1) средний размер везикул и распределение их по размерам; 2) распределение белка в популяции везикул; 3) ориентация белка по отношению к плоскости бислоя; 4) проницаемость везикул. Эти характеристики особенно важны, если фермент катализирует трансмембранный перенос веществ или ионов. Для количественного анализа кинетики таких ферментов необходимо знать внутренний объем везикул, их проницаемость и распределение белка. Для ферментов, катализирующих векторные реакции (например, для цитохром *c*-оксидазы, переносящей протоны только в одном направлении), молекулы, которые имеют противоположную ориентацию и находятся в одной везикуле, будут работать «вхолостую», компенсируя друг друга при создании результирующего ионного градиента.

1. *Размер везикул.* Размер везикул сильно зависит от процедуры реконструкции. Для его определения лучше всего использовать методы электронной микроскопии или гель-фильтрации. При удалении детергента диализом образуются протеолипосомы диаметром от 500 до 2500 Å в зависимости от белка и используемого метода. При любом способе реконструкции размеры получаемых везикул варьируют в довольно широких пределах; протеолипосомы нужного диаметра можно затем отделить с помощью гель-фильтрационной хроматографии [993, 903].

2. *Распределение белка.* Когда при реконструкции используется диализ для удаления детергента из смеси, содержащей избыток липида, распределение белка между полученными везикулами должно подчиняться распределению Пуассона [39]. Однако на самом деле оно может зависеть от встраиваемого белка и методических деталей. Следует отметить, что при спонтанном встраивании в предварительно полученные липосомы некоторые белки включаются преимущественно в везикулы малых размеров. Цитохром *b*₅, например, в 200 раз эффективнее встраивается в везикулы диаметром 200 Å, чем 1000 Å [547].

3. *Ориентация белка.* Этот вопрос важен с точки зрения энзимологии, поскольку белок, активный центр которого локализован внутри везикулы, может быть недоступен для субстрата. Как ни удивительно, многие ферменты, например цитохром *c*-оксидаза [903, 191], Na^+/K^+ -АТФаза [39], глицерол-3-фосфатацилтрансфераза [544], бактериородопсин [323], способны встраиваться в мембрану таким образом, что их активный центр с вероятностью 75—95% оказывается снаружи везикулы. Везикулы, содержащие цитохром *c*-оксидазу, с помощью ДЭАЭ-хроматографии удается разделить на две популяции: с активным центром, ориентированным внутрь, и с активным центром, ориентированным наружу [1629]. В принципе такой способ разделения пригоден и для других белков.

Причина такой асимметрии встраивания неизвестна. В некоторых (но не во всех) случаях ориентированная наружу часть фермента имеет больший размер, а встраивание белка более массивной частью внутрь везикулы невыгодно. Поскольку преимущественная ориентация наблюдается и при встраивании белков в крупные липосомы, по-видимому, асимметрия встраивания не связана с кривизной везикулы, как в случае распределения липидов в везикулах малых размеров (разд. 4.4.2). Вероятно, важную роль играют какие-то кинетические факторы, однако их трудно оценить, поскольку неясна природа переходных состояний.

Нельзя не отметить также, что некоторые белки встраиваются в везикулы неправильным образом, т. е. в конформации, отличной от нативной. Наиболее типичный пример — цитохром *b*₅, который в зависимости от метода реконструкции может находиться в одной из двух конформаций ([219]; разд. 4.4.2). Такое поведение характерно также для компонента Н-2К главного комплекса гистосовместимости у мышей [185] и, возможно, для белка оболочки бактериофага М13 [1574]. Все эти белки имеют один трансмембранный гидрофобный домен, и при некоторых условиях он включается в бислой в U-образной конфигурации, когда N- и C-концевые аминокислотные группы экспонированы наружу.

4. *Проницаемость.* Важность этой характеристики для ферментов, катализирующих перенос веществ или ионов через бислой, несомненна. Многие системы транспорта и ионные насосы изучали после встраивания их в протеолипосомы (гл. 8), и очевидно, что протеолипосомы, пригодные для таких исследований, должны обладать достаточно низкой проницаемостью. Присутствие белка обычно приводит к увеличению проницаемости везикул, но степень этого увеличения очень сильно зависит от выбора липида и от числа молекул белка на везикулу [993, 185]. Высказывалось предположение, что молекулы некоторых липидов благодаря их форме лучше упаковываются вокруг встроженных в бислой белков; тем самым

сглаживаются дефекты структуры на границе белок—липид и уменьшается их проницаемость для растворенных веществ [185]. Однако прямые доказательства по этому поводу отсутствуют.

6.4. Влияние липидов на активности мембраносвязанных ферментов [463, 1280, 1278, 1279, 503]

Каталитическая активность многих мембранных ферментов зависит от липидов. Липиды при этом могут выполнять две функции: 1) создавать необходимую среду; 2) действовать как аллостерический регулятор, модулирующий активность фермента. В первом случае липиды не только предотвращают денатурацию ферментов, но и облегчают взаимодействие ферментов друг с другом и с прочими мембраносвязанными компонентами, в частности с липофильными субстратами. В качестве аллостерических эффекторов липиды обычно активируют фермент преимущественно путем стабилизации его в определенной конформации. В принципе две эти функции липидов совершенно различны, однако разграничить их экспериментально бывает крайне трудно. В идеальной экспериментальной системе аллостерическим эффектором должен быть специфический липид, а необходимое для работы окружение фермента должно создаваться всей основной массой липидов в бислое. К сожалению, пока обнаружен только один пример абсолютной специфичности фермента к определенному липиду. β -Гидроксibuтиратдегидрогеназа для проявления каталитической активности необходим именно фосфатидилхолин [1277], в большинстве же случаев ферменты достаточно эффективно активируются различными липидами. А поскольку любой липид может в той или иной степени выполнять как функцию окружения, так и функцию специфического аллостерического эффектора, различить эти два эффекта становится практически невозможно. На ферментативную активность может влиять также физическое состояние бислоя, в частности поверхностная плотность заряда и вязкость. Систематически подбирая липиды разной структуры и изменяя физическое состояние мембраны, можно установить корреляции между активностью фермента и этими параметрами, но само по себе такое исследование еще не позволяет разграничить две функции липидов. Изменение физического состояния бислоя может влиять на взаимодействие с ферментом любых липидов, в том числе и тех, которые функционируют как аллостерические эффекторы. При изучении ферментов, субстратом которых служат липофильные соединения, возникают особые проблемы, поскольку такие субстраты должны быть включены в бислой до или после получения везикул, а большие концентрации раство-

ренного в бислой субстрата не могут не сказаться на физическом состоянии модельной мембраны.

Для исследования влияния липидов на мембранные ферменты применяется еще одна стратегия — так называемый метод смешанных мицелл. Фермент растворяют в детергенте, не активирующем его, и к смеси добавляют липиды [1276, 1545]. Многие мембранные ферменты сохраняют определенную активность и в детергенте, причем такая активность сильно зависит не только от природы фермента, но и от выбранного детергента, а также, возможно, от наличия эндогенных липидов в препарате очищенного фермента. Вообще говоря, для метода смешанных мицелл желательнее полностью освободить фермент от липида, однако для этого иногда приходится использовать весьма грубые процедуры, которые могут привести к денатурации белка. Методы полного обезжиривания обычно основаны на пропускании препарата фермента через среду с большим избытком детергента. Для этого используют гель-фильтрацию, центрифугирование в градиенте плотности сахарозы или связывание фермента с каким-либо твердым носителем (например, ДЭАЭ-сефарозой) с последующим промыванием избытком детергента [1105, 1551].

Метод смешанных мицелл имеет еще и то преимущество, что липофильный субстрат можно добавить в мицеллах того же детергента, хотя в этом случае могут возникнуть трудности, связанные с пространственным разделением фермента и субстрата, о котором мы говорили в разд. 6.2 [1545]. Наблюдаемые в такого рода системах эффекты липидов являются преимущественно аллостерическими, поскольку здесь нет бислоя, а связывание липидов с белком происходит в глобулярной мицелле в присутствии большого количества детергента. К сожалению, физическое состояние комплекса фермент—детергент—фосфолипид определить практически невозможно, и это серьезный недостаток описываемого подхода.

Любые эффекты, наблюдаемые в такой системе для какого-либо липида, должны быть получены с использованием нескольких не активирующих фермент детергентов. Только в этом случае можно быть уверенным, что детергент нейтрален. К сожалению, такие работы встречаются не часто.

Результаты исследования многих систем позволяют сделать несколько общих выводов.

1. Для активации фермента очень редко бывает необходим липид с какой-то строго определенной структурой. Безусловно, одни липиды активируют данный фермент с большей эффективностью, чем другие, однако такое предпочтение может зависеть от условий измерения, а уж говорить о его физиологическом значении как минимум преждевременно. Вполне может оказаться, что липид, с высокой эффективностью активирующий фермент, вообще не присут-

ствуется в мембране, из которой этот фермент выделен. Поэтому к утверждениям о специфичности липида следует относиться с осторожностью [1278].

2. Измеряемая в системе со смешанными мицеллами зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации липида обычно свидетельствует о высокой кооперативности процесса [1279]. Такое поведение можно объяснить, в частности, тем, что липиды связываются некооперативно с несколькими эквивалентными центрами на ферменте, но активными являются только те молекулы фермента, у которых занята большая часть липидсвязывающих центров [1279, 1277]. Нередко при активации фермента липидом наблюдается оптимум в концентрационной зависимости, вероятно связанный с достижением определенного соотношения между липидом и детергентом и образованием в такой смеси конкретных структур.

3. Сама по себе бислойная структура не является необходимой для активации ферментов, поскольку многие ферменты проявляют активность в присутствии детергента или в составе липидно-детергентных мицелл. Известны случаи, когда мембранные ферменты эффективно активируются липидами, вообще не формирующими стабильные бислои [709].

4. Важным параметром, определяющим активность большинства мембранных ферментов, безусловно является физическое состояние бислоя. Однако четких данных о физиологической регуляции ферментативной активности с помощью этого параметра *in vivo* нет. При переходе липидов в фазу геля многие ферменты становятся неактивными либо их активность резко уменьшается. В литературе есть масса примеров, когда изменения скорости работы фермента с температурой коррелировали с изменением физического состояния липидов (см., например, [463]). В этих работах основное внимание обращалось на корреляцию между точками перегиба в температурных зависимостях ферментативной активности и какой-либо характеристикой, отражающей физическое состояние липида (например, анизотропией флуоресценции связанного красителя). Выявить связь ферментативной активности с вязкостью мембраны, исходя из температурной зависимости, весьма непросто, поскольку температура влияет одновременно на очень многие параметры. Следует иметь в виду, что вязкость мембраны в значительной степени коррелирует с плотностью упаковки молекул липида в бислой, и индуцируемые температурой изменения вязкости можно объяснить в основном изменениями в плотности упаковки. Существует очень немного примеров четкой линейной корреляции между активностью фермента и вязкостью мембраны [504, 216]. Неясно, правда, как интерпретировать эту корреляцию с точки зрения механизма ферментативной реакции. И лишь в нескольких работах содер-

жатся указания на то, какая или какие из стадий ферментативной реакции являются лимитирующими и модулируются связыванием липида [1278]. В связи с этим необходимо упомянуть, что липиды могут сильно влиять не только на максимальную скорость, но и на связывание фермента с субстратами и кофакторами [640, 1083].

5. Вообще говоря, при исследовании взаимодействия с определенным ферментом большого числа разных липидов корреляции между активностью фермента и каким-либо одним параметром (например, вязкостью) не наблюдается [117, 189, 364]. Пока липид находится в жидкокристаллическом состоянии, для ферментативной активности часто более важна структура полярной головки липида, чем вязкость бислоя. Другими словами, важна химическая структура индивидуальных липидов, а почему — это уже отдельный вопрос.

6.5. Некоторые примеры липидзависимых ферментов

Рассматриваемые ниже пять ферментов выбраны в качестве примеров потому, что, во-первых, они лучше всего изучены и охарактеризованы; во-вторых, они охватывают несколько типов мембранных ферментов; в-третьих, они могут служить иллюстрацией нескольких основных проблем, возникающих при исследовании липидзависимой активации.

6.5.1. β -ГИДРОКСИБУТИРАТДЕГИДРОГЕНАЗА (БДГ) [941, 379, 1277, 249]

Это один из наиболее хорошо изученных активируемых липидом ферментов и единственный фермент, обладающий абсолютной специфичностью к определённому липиду: активировать БДГ способен только фосфатидилхолин. БДГ локализуется на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны и катализирует окисление β -гидроксибутирата с помощью NAD^+ . Оба субстрата водорастворимы. Молекулярная масса субъединицы фермента равна 31 кДа, но ее аминокислотная последовательность до конца не установлена. БДГ скорее всего не является трансмембранным белком. Получаемый после очистки фермент свободен от фосфолипидов и детергента и способен спонтанно встраиваться в фосфолипидные везикулы. Хотя БДГ связывается и с везикулами, не содержащими фосфатидилхолина, каталитическую активность фермент начинает проявлять только в присутствии фосфатидилхолина. При встраивании фермента в везикулу, по-видимому, происходит не только взаимодействие с поверхностью мембраны, но и значительное погруже-

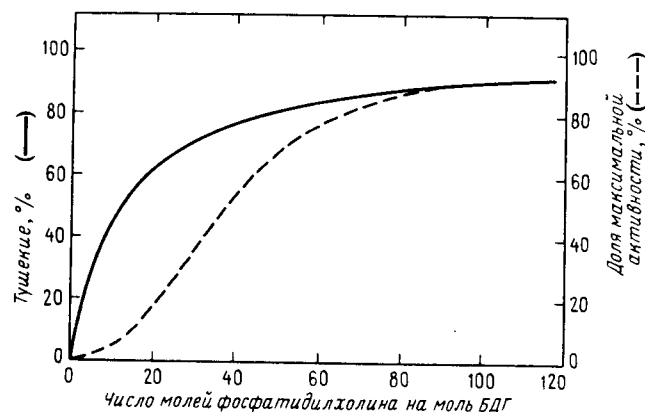


Рис. 6.2. Сравнение активации D-β-гидроксibuтиратдегидрогеназы (БДГ) и тушения флуоресценции триптофановых остатков белка фосфатидилхолином [1277]. Каждый образец содержал одинаковое количество неактивирующего липида (112 моль на моль фермента) плюс указанное количество фосфатидилхолина. Добавляемый фосфатидилхолин представлял собой смесь диолеилфосфатидилхолина и 2-пиренилфосфатидилхолина в соотношении 1:1. За тушение флуоресценции ответствен второй компонент смеси. Отметим, что кривые насыщения биохимического ответа (активации) и физического взаимодействия (тушения флуоресценции) существенно образом различаются.

ние белка в бислой, а также изменения конформации белка [941, 379]. Кинетические свойства фермента и его тетрамерной формы одинаковы в митохондриальной мембране и после реконструкции с митохондриальными липидами.

На рис. 6.2 приведена кривая активации БДГ фосфолипидными везикулами, содержащими разное количество фосфатидилхолина. Во всех случаях фермент встроен в липосомы. Зависимость скорости ферментативной реакции от содержания фосфатидилхолина в бислое указывает на высокую кооперативность процесса, в котором участвуют два необходимых для активации липидсвязывающих центра [1277, 249]. Кроме того, по данным о тушении флуоресценции триптофана производными фосфатидилхолина отдельно была определена доступность молекул фосфатидилхолина для БДГ [1277]. Степень тушения флуоресценции фактически является мерой связывания липида. Оказалось, что фосфатидилхолин связывается некооперативно с примерно 12 центрами в молекуле фермента. Такое некооперативное связывание с довольно большим числом центров весьма типично для мембранных белков в бислое (см. разд. 5.5). Кроме того, основная часть флуоресценции тушится при более низких концентрациях фосфатидилхолина, чем необходимо

для активации. Такое расхождение между связыванием липида и активацией фермента можно объяснить, если предположить, что в активации участвует только очень небольшая часть центров, которые не удастся выявить в экспериментах по тушению флуоресценции. Приведенные результаты интересны еще и тем, что позволяют сопоставить физическое взаимодействие определенного липида и фермента с биохимическим ответом (активацией).

Интерпретация результатов таких экспериментов осложняется тем, что активность фермента может сильно зависеть от степени его агрегации, т. е. активность фермента в различных липидах, по-видимому, будет соответствовать степени его дезинтеграции [1173]. БДГ замечателен еще и тем, что это один из немногих ферментов, активируемых короткоцепочечными гомологами фосфатидилхолина, которые связываются с ферментом и активируют его в концентрациях ниже критической концентрации мицеллообразования [248]. Эти данные тоже подтверждают, что в активацию липидом вовлечено только небольшое число центров связывания на белке.

6.5.2. ПИРУВАТОКСИДАЗА

Эта флавиносодержащая дегидрогеназа из *E. coli*, катализирующая окисление пирувата до уксусной кислоты и CO_2 и восстановление убихинона в цитоплазматической мембране, обеспечивает поступление электронов в аэробную дыхательную цепь [770, 40]. Фермент обладает рядом замечательных особенностей. Он растворим в воде и не проявляет никаких характерных для мембранного белка свойств. Однако в присутствии субстрата и кофактора (тиаминпирозинфосфата) происходит изменение конформации белка, в результате чего формируется центр связывания с мембраной. В этих условиях резко возрастает сродство фермента к детергентам и фосфолипидным везикулам, и белок по своим свойствам становится похож на истинный мембранный фермент. Пируватоксидаза может служить примером фермента, который является цитоплазматическим, пока субстрата мало, но превращается в мембранный, как только концентрация субстрата становится достаточно высокой. Другие примеры подобного рода ферментов описаны в разд. 6.7.

Наибольший интерес при исследовании этого фермента представляла его эффективная активация липидами. Активность фермента можно измерить, используя вместо природного мембраносвязанного акцептора — убихинона какой-либо растворимый в воде искусственный акцептор электронов, например феррицианид. В присутствии липидов каталитическая активность пируватоксидазы возрастает до 50 раз. В отличие от β-гидроксibuтиратдегидрогеназы этот фермент активируется самыми разнообразными фосфолипидами и детергентами [106]. В концентрациях ниже критических кон-

центраций мицеллообразования фермент полностью активируется как анионными, так и катионными детергентами, а исследование связывания детергентов показывает, что в активации участвует очень небольшое число центров связывания [1304]. Связывание фермента с фосфатидилхолиновыми везикулами или детергентами не происходит до тех пор, пока не добавлены субстрат и кофактор. В присутствии субстрата и кофактора пируватоксидаза способна связываться и активироваться разнообразными везикулами, полученными из целого ряда фосфолипидов. Связывание происходит в первую очередь за счет гидрофобных, а не электростатических взаимодействий [106, 1304]. Связывание липида и активация в случае пируватоксидазы, по-видимому, неразделимы, хотя и не все везикулы связываемого фосфолипиды или амфифильного соединения ответственны за активацию фермента. Активация липидами вызывает изменения в спектре поглощения связанного флавина, вероятно, вследствие облегчения реакции переноса электронов [936].

Конформационные изменения в молекуле пируватоксидазы приводят не только к образованию липидсвязывающего домена, но и к появлению чувствительного к протеазам участка цепи вблизи С-конца. Протеолиз подавляет связывание липидов, но, как это ни удивительно, вызывает активацию фермента в отношении реакции восстановления водорастворимых искусственных акцепторов электронов [1263]. Активированный протеазами фермент, однако, уже не может восстанавливать мембраносвязанный убихинон, поскольку утрачивает способность связываться с мембраной.

Как показывают результаты клонирования и секвенирования гена, кодирующего пируватоксидазу, аминокислотная последовательность белка не имеет протяженных гидрофобных участков. Генетические исследования [197], а также данные по протеолизу [1263] показали, что за связывание липида ответствен участок полипептида, локализованный вблизи С-конца. В этом участке имеется короткая потенциально амфифильная α -спираль, которая и может участвовать в связывании с поверхностью бислоя [1206]. Получен мутантный штамм *E. coli*, у которого пируватоксидаза лишена последних 24 аминокислотных остатков [536]. Такой фермент полностью неактивен *in vivo*, но *in vitro* успешно катализирует реакцию с водорастворимым акцептором электронов. Предположительно такой мутантный вариант пируватоксидазы не способен связываться с мембраной даже при высоких концентрациях субстратов, а значит, не может осуществлять катализ, поскольку для этого фермент должен окисляться убихиноном. Приведенное исследование является хорошим примером того, как данные по связыванию липида и активации, полученные *in vitro*, могут с успехом применяться для объяснения механизма функционирования фермента в клетке.

И пируватоксидаза, и β -гидроксibuтиратдегидрогеназа могут ак-

тивироваться либо 1) при связывании с небольшим числом молекул амфифильного соединения, либо 2) при связывании с поверхностью бислоя. В последнем случае некоторая часть белка проникает в глубь мембраны. Оба рассмотренных примера четко иллюстрируют роль фосфолипидов как аллостерических регуляторов.

6.5.3. Ca^{2+} -АТРаза (см. также разд. 8.4.1 и обзор [629])

Если предыдущие два примера иллюстрируют роль липидов как аллостерических эффекторов мембранных белков, то Ca^{2+} -АТРаза и еще два фермента, рассмотренные ниже, являются примерами ферментов, на активность которых влияют структура липида и физическое состояние бислоя. Выделенная из саркоплазматического ретикула скелетных мышц Ca^{2+} -АТРаза состоит из единственной полипептидной цепи с мол. массой 115 кДа. Фермент осуществляет активный транспорт Ca^{2+} внутрь саркоплазматического ретикула, уменьшая тем самым концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме во время релаксации мышцы. На каждую гидролизованную молекулу АТФ через мембрану переносятся два иона Ca^{2+} , и реакция является электрогенной, т. е. перенос зарядов через бислой создает трансмембранный электрический потенциал. По результатам секвенирования соответствующего гена установлена аминокислотная последовательность белка. Предполагается, что полипептид имеет 10 трансмембранных спиральных участков ([134]; рис. 8.13). Структура и предполагаемый механизм ионного транспорта обсуждаются в разд. 8.4.1.

В мембране саркоплазматического ретикула фермент, по-видимому, образует димеры [671, 1057a], но мономерная форма в мицеллах детергента сохраняет основные кинетические свойства (естественно, измерить перенос иона в такой системе не представляется возможным) [928]. С помощью процедуры дезоксихолатного диализа очищенная Ca^{2+} -АТРаза может быть успешно встроена в везикулы [209]. В некоторых препаратах реконструированный фермент образует более крупные агрегаты, чем димеры, хотя физиологическое значение этого процесса неясно [406].

В ряде лабораторий изолированный фермент был полностью обезжирен и реконструирован с целым рядом липидов и липидных смесей. На рис. 6.3 представлена зависимость активности АТРаза от количества связанного с ферментом липида в отсутствие детергентов [1551]. Из приведенных данных видно, что для полной активации на одну молекулу АТРаза должно приходиться 30 молекул фосфолипидов; этого количества, по оценкам, достаточно, чтобы образовать вокруг каждой молекулы белка фосфолипидный монослой. Столь прямолинейная интерпретация этих данных, по-видимому, неправомерна, поскольку нам неизвестно физическое состояние та-

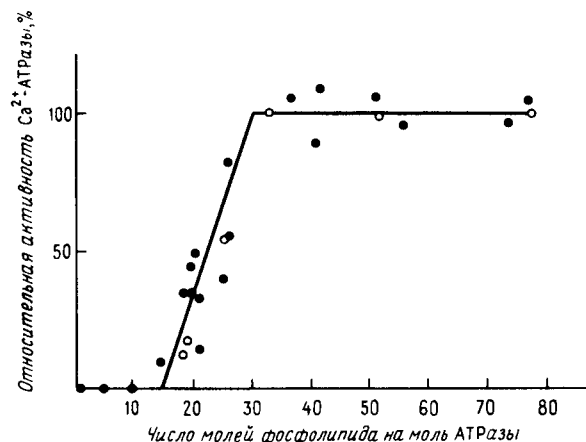


Рис. 6.3. Зависимость активности Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума от содержания фосфолипида [1551]. Везикулы саркоплазматического ретикулума обрабатывали холатом для удаления фосфолипида и приготовления образцов с различным соотношением липид/белок (светлые кружки). Замещение фосфолипидов холестерином (темные кружки) приводит к тому же результату, что и удаление фосфолипидов. Из представленных данных следует, что холестерин не восстанавливает ферментативную активность и не связывается с ближайшим липидным окружением фермента, поскольку активация фосфолипидом не зависит от присутствия холестерина.

кой смеси. На основании результатов этой работы была предложена концепция пограничных, или аннулярных, липидов, т. е. липидов, непосредственно граничащих с белком [98]. Критическим фактором, определяющим ферментативную активность, согласно этой концепции, должен быть липидный состав этого аннулярного слоя. Отсутствие влияния холестерина, включенного в фосфолипидно-белковые комплексы, предполагает, что холестерин не включается в аннулярный слой [1551], однако соответствующие данные по связыванию холестерина показали, что это не так (см. разд. 5.5). Вообще говоря, на основании одних лишь кинетических данных понять механизм связывания липида довольно трудно.

В нескольких работах было достоверно доказано, что выше температуры фазового перехода липида отсутствует корреляция между вязкостью или параметром упорядоченности бислоя и ферментативной активностью (стимулируемым Ca^{2+} гидролизом АТФ и транспортом Ca^{2+} внутрь везикул в хорошо сопряженной системе) [364, 209, 174]. В регуляции ферментативной активности более важную роль, безусловно, играет структура самого липида, чем любой отдельно взятый параметр, отражающий физическое состояние бислоя. Но почему одни липиды активируют встроенные в везикулы ферменты лучше, чем другие, пока неизвестно.

6.5.4. Na^+/K^+ -АТФаза (см. также разд. 8.4.1 и обзоры [39, 714])

Этот фермент катализирует АТФ-зависимый транспорт ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану животных клеток. На каждую молекулу гидролизованного АТФ из клетки выводятся три иона Na^+ и поступают два иона K^+ . Фермент является электрогенным ионным насосом, генерирующим трансмембранный потенциал. Na^+/K^+ -АТФаза выделена в чистом виде из нескольких источников. Она всегда состоит из двух субъединиц: большой каталитической субъединицы (α , мол. масса ~ 115 кДа) и малой, представляющей собой гликопротеин (β , мол. масса ~ 55 кДа). Функция β -субъединицы неясна. Полные аминокислотные последовательности обеих субъединиц известны для Na^+/K^+ -АТФазы из почек овцы [1337, 1338] и из электрического органа ската *Torpedo californica* [1077, 733]. Каталитическая субъединица гомологична Ca^{2+} -АТФазе и также образует значительное число трансмембранных спиральных участков (судя по профилю гидропатичности). β -Субъединица, по-видимому, также пересекает мембрану; вероятно, трансмембранным является и единственный спиральный сегмент. Более подробно структура и механизм работы фермента обсуждаются в разд. 8.4.1.

Функционирующей формой фермента, по-видимому, является либо гетеродимер $\alpha\beta$, либо тетрамер $(\alpha\beta)_2$; исследователи пока не пришли к единому мнению относительно минимальной единицы, необходимой для ионного транспорта. Очищенный фермент удается реконструировать с целым рядом фосфолипидов [752], но для восстановления активности наиболее эффективны фосфатидилсерин и фосфатидилглицерол. Причина этого неясна, но показано также, что фермент в бислой несколько лучше связывается с кислыми фосфолипидами (см. разд. 5.5). Липидное окружение влияет не только на каталитическую активность, но и на чувствительность фермента к специфическому ингибитору убаину [1].

Для реконструкции Na^+/K^+ -АТФазы в первую очередь важна структура полярных головок фосфолипидов, но определенную роль, по-видимому, играет и вязкость бислоя. Об этом свидетельствуют результаты экспериментов по изменению с увеличением гидростатического давления вязкости липидов в содержащих фермент препаратах плазматической мембраны [216]. Высокое давление стабилизирует систему в конфигурации с минимальным объемом. Поэтому с увеличением гидростатического давления свободный объем и вязкость бислоя уменьшаются (т. е. увеличивается плотность упаковки липидных молекул). Как видно из рис. 6.4, между ферментативной активностью и вязкостью мембраны, измеряемой по степени анизотропии флуоресценции мембранных зондов, наблюдается четкая корреляция. Авторы полагают, что изменение свойств бислоя при повышении давления приводит к стабилизации определенных конформационных состояний фермента в ходе каталитического цикла,

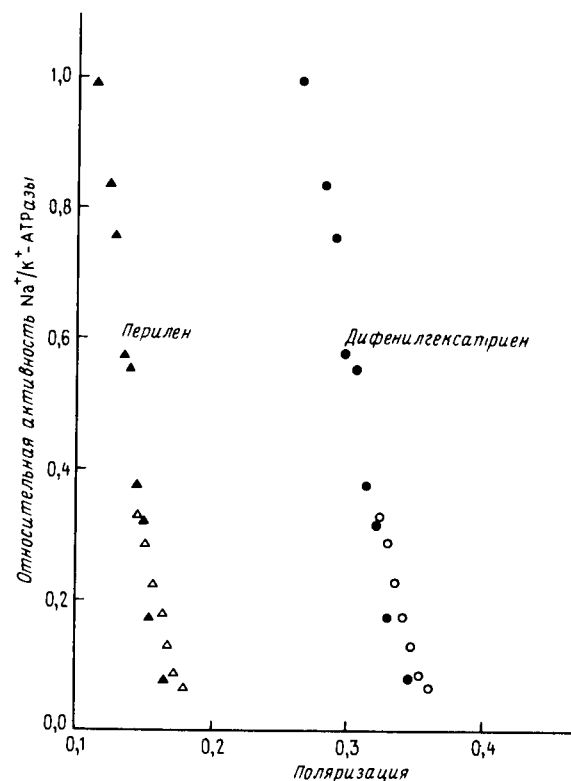


Рис. 6.4. Корреляция между активностью Na^+/K^+ -АТФазы и поляризацией флуоресценции мембранных зондов (перилена и дифенилгексатриена) в одних и тех же протеополисомах [216]. Светлые и темные символы соответствуют измерениям при 22 и 36 °C соответственно. Для обеих температур активность фермента и поляризацию измеряли при разных значениях гидростатического давления. Для каждого зонда при таких комбинациях температуры и давления, которые дают одно и то же значение поляризации, наблюдаются также и одинаковые активности фермента. Проще всего объяснить эти результаты влиянием параметра упорядоченности липидов или их вязкости на число оборотов фермента.

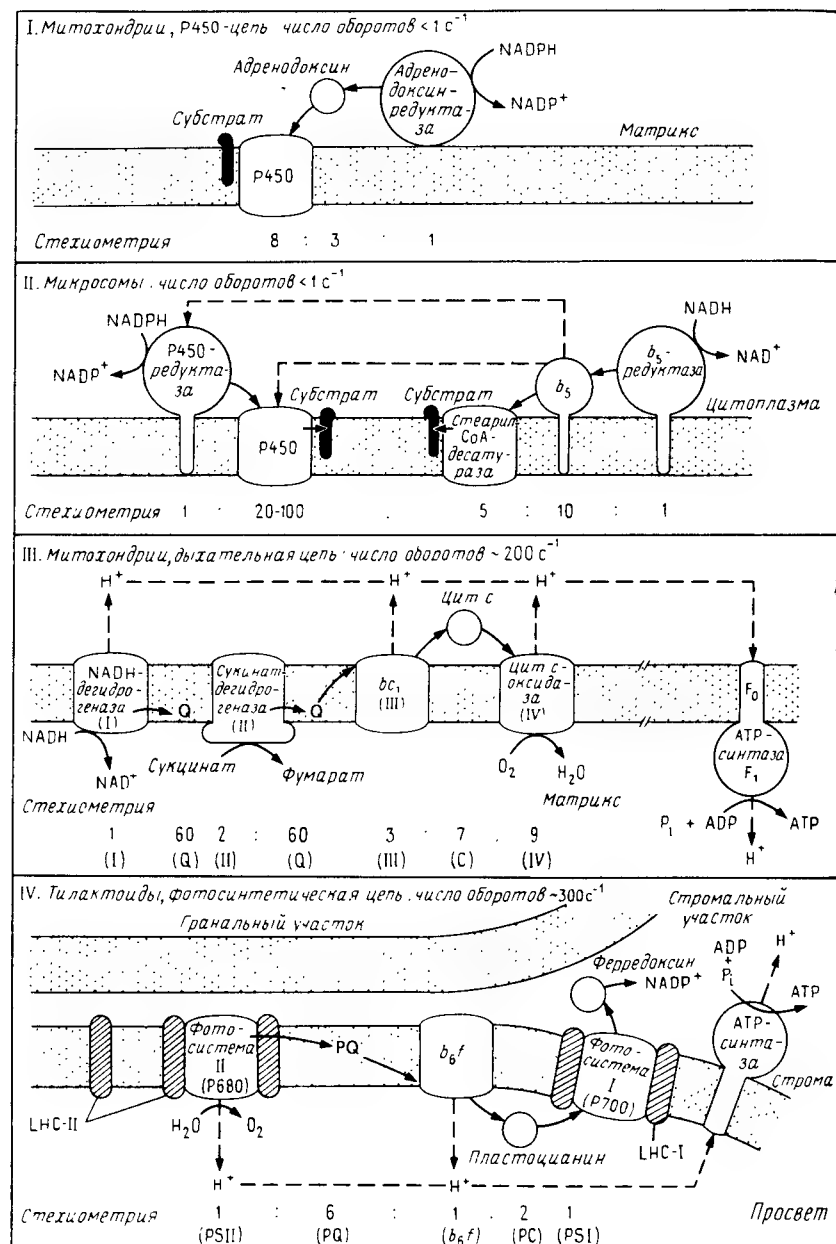
что влияет на лимитирующую стадию (или стадии) суммарной реакции (см. разд. 8.4.1). Нельзя, однако, исключить и иное объяснение: давление влияет на фермент прямо, а не опосредованно через липид. Впрочем, эти эксперименты важны уже тем, что показывают возможность изменения физического состояния мембраны под действием гидростатического давления.

6.5.5. ПЕРЕНОСЧИК ГЛЮКОЗЫ (см. также разд. 8.3.1 и обзор [189])

Как и предыдущие два фермента, этот белок участвует в транспорте, но не в активном транспорте ионов, а в облегченной диффузии. Переносчик глюкозы катализирует транспорт сахаров по градиенту концентрации через мембрану эритроцитов. Он представляет собой гликопротеин мол. массой 55 кДа. Исходя из первичной структуры, можно предположить, что он имеет 12 трансмембранных спиральных доменов. Переносчик удается реконструировать с разнообразными липидами и липидно-холестероловыми смесями. Как показывают результаты экспериментов по реконструкции, для реализации каталитической функции белка наиболее важным фактором является структура полярной головки фосфолипидов, а к наименее существенным относятся вязкость бислоя или параметр упорядоченности. Липид влияет как на максимальную скорость, так и на сродство фермента к сахару (K_m). Поразителен, однако, тот факт, что на максимальную скорость работы этого переносчика вообще не влияет температурный фазовый переход липида из жидкокристаллического состояния в гель (правда, лишь в том случае, когда переносчик реконструирован с фосфатидилглицеролом, но не с фосфатидилхолином).

6.6. Мембраносвязанные электротранспортные цепи

В большинстве работ, посвященных мембранным ферментам, исследовались компоненты различных мембранных систем электронного транспорта. Эти системы выполняют весьма важные биохимические функции, а их компоненты содержат окрашенные протетические группы (флавины, гемовое или негемовое железо), что позволяет следить с помощью спектрофотометрического метода за кинетикой их редокс- или конформационных превращений как в нативной мембране, так и после выделения и очистки отдельных ферментов. Здесь мы рассмотрим четыре основные электротранспортные системы, схематически изображенные на рис. 6.5. Это: 1) участвующая в биосинтезе стероидов, содержащая цитохром P450 система митохондрий коры надпочечников; 2) система микросомного окисления, включающая множество цитохромов P450, а также цитохром b_5 ; 3) дыхательная цепь митохондрий; 4) фотосинтетическая система тилакоидов зеленых растений. Все четыре системы являются основными белковыми компонентами мембран, в которых они локализованы, и могут служить иллюстрацией различных уровней организации мультиферментных комплексов в мембранной энзимологии. Первые две системы катализируют анаболи-



ческие и катаболические реакции, протекающие в присутствии молекулярного кислорода и обычно липофильных мембраносвязанных субстратов. Терминальные ферменты этих электронтранспортных цепей, цитохром P450 и десатураза жирных кислот, характеризуются очень низким числом оборотов ($< 1 \text{ с}^{-1}$). Системы (3) и (4) являются основными электронтранспортными ансамблями энергетического обмена, первичная функция которых состоит в переносе протонов через мембрану. Генерируемый при этом градиент электрохимического потенциала протонов (протондвижущая сила) используется для синтеза АТФ. В отличие от микросомной и митохондриальной систем цитохрома P450, дыхательная и фотосинтетическая цепи катализируют трансмембранные реакции и характеризуются довольно высоким числом оборотов, 200—300 с^{-1} . В приведенном ниже кратком обзоре основное внимание обращается на частные вопросы, интересные с точки зрения энзимологии, отмечаются некоторые общие черты, а также представляющие особый интерес дискуссионные моменты.

При рассмотрении любой из этих систем, естественно, возникает вопрос: до какой степени могут взаимодействовать друг с другом различные мембраносвязанные компоненты этих электронтранспортных цепей, с тем чтобы образовались долгоживущие комплексы? Теоретическое рассмотрение вероятности ассоциации мембранных белков [540] показывает, что наиболее важны следующие факторы: 1) высокая концентрация реакционноспособных белков из-за ограниченности мембранного пространства; 2) заранее заданная ориентация белков, поскольку они могут вращаться лишь в плоскости, параллельной плоскости мембраны; вращение перпендикулярно поверхности бислоя запрещено; 3) исключенный объем, связанный с наличием в мембране других белков, что приводит к еще большему концентрированию компонентов этих систем.

6.6.1. СИСТЕМА СИНТЕЗА СТЕРОИДОВ В МИТОХОНДРИЯХ [1423, 592]

Выделяемые надпочечниками стероидные гормоны, такие, как кортизон, синтезируются из холестерина в ходе реакций, катализи-

Рис. 6.5. Сравнение четырех наиболее хорошо изученных электронтранспортных цепей. Сплошными стрелками показаны реакции переноса электронов, пунктирными — реакции переноса протонов. Пунктирные стрелки на схеме II указывают на существование прямого физического взаимодействия между цитохромом b_5 и двумя другими ферментами (см. текст). ЛНС — светособирающие комплексы. Кроме того, указаны приблизительные стехиометрия и число оборотов ферментов. Реальные размеры и форма ферментов не соответствуют изображенным.

руемых ферментами, которые локализованы в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. При этом промежуточные продукты метаболического пути должны «курсировать» между данными органеллами. Реакции катализируются мембраносвязанными гемсодержащими белками — цитохромами P450. Название этой большой группы ферментов связано с тем, что максимум их поглощения приходится на длину волны 450 нм. Эти ферменты являются оксидазами со смешанной функцией; в катализируемой ими реакции происходит расщепление молекулы кислорода, при этом один атом кислорода включается в состав молекулы воды, второй — в субстрат. В биосинтезе стероидов участвуют четыре цитохрома P450. Два находятся в митохондриях, два — в эндоплазматическом ретикулуме ткани. Необходимые для реакции электроны поступают в систему через относительно простую электронтранспортную цепь.

В митохондриях коры надпочечников источником электронов для синтеза гормонов является NADPH, который восстанавливает флавопротеин (адренодоксинредуктазу) и ферредоксин (адренодоксин). Эти белки локализованы на матричной стороне внутренней митохондриальной мембраны. Два цитохрома P450, P450_{sc} (от англ. side chain cleavage, расщепление боковой цепи) и P450_{11β}, являются интегральными мембранными ферментами, способными взаимодействовать с мембраносвязанными субстратами. Адренодоксинредуктаза, возможно, частично погружена в бислой, но легко отделяется от мембраны. Адренодоксин — это низкомолекулярный растворимый белок (12 кДа), он переносит электроны от флавопротеина к цитохромам P450 [815, 816]. Взаимодействие адренодоксина с редуктазой и цитохромами P450 осуществляется главным образом с помощью ионных взаимодействий. Вероятно, с обоими реакционными партнерами адренодоксин связывается с помощью одного и того же домена. Такой же способ передачи электронов между двумя мембранными ферментами при участии небольшого растворимого белка можно обнаружить и в дыхательной (цитохром c), и в фотосинтетической (пластоцианин) электронтранспортных системах. Связывание стероидных субстратов с цитохромами P450 можно зарегистрировать по изменениям в спектре поглощения гема. Холестерольсвязывающий центр, по-видимому, экспонирован в гидрофобную область липидного бислоя [772]. Показано также, что связывание холестерина более чем в 10 раз увеличивает сродство адренодоксина к цитохрому P450 [814].

Число оборотов адренодоксина гораздо выше, чем двух указанных ферментов, поэтому одна молекула восстановленного адренодоксина может обеспечить электронами несколько молекул цитохрома P450. Указанная на рис. 6.5 стехиометрия компонентов (редуктаза:адренодоксин:P450 = 1:3:8) при условии, что лимитирующим является функционирование цитохромов P450, создает свое-

образный эффект электронного каскада [592]. Очевидно, что при таких обстоятельствах три компонента этой простой системы не смогут образовать единый суперкомплекс, да и вряд ли формирование такого комплекса способствовало бы эффективному переносу электронов по цепи.

6.6.2. МИКРОСОМНЫЕ ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНЫЕ ЦЕПИ

Электронтранспортные цепи, локализованные на цитоплазматической поверхности эндоплазматического ретикулума, участвуют также в метаболических превращениях липофильных субстратов. Как видно из рис. 6.5, существуют две такие системы, но, как недавно выяснилось, они не являются независимыми. В одной системе NADH окисляется флавопротеином цитохром *b*₅-редуктазой, которая в свою очередь через цитохром *b*₅ восстанавливает стеарил-CoA-десатуразу. В микросомах печени десатураза является индуцибельным ферментом. Вторая система включает в себя окисление NADPH другим флавопротеином, цитохром P450-редуктазой, которая затем передает электроны на целое семейство цитохромов P450. Одни из этих цитохромов также являются индуцибельными, другие — конститутивными. Отметим, что в обеих системах число терминальных ферментов (десатуразы или P450) значительно превышает число редуктаз в начале каждой цепи (см. рис. 6.5). Как и в P450-содержащей системе митохондрий, число оборотов терминальных ферментов настолько мало, что небольшое число редуктаз вполне успевает обеспечить восстановительными эквивалентами все молекулы терминальных ферментов. Микросомная система не содержит каких-либо растворимых белковых компонентов, аналогичных адренодоксину; все ферменты представляют собой интегральные мембранные белки, их можно выделить из мембраны, очистить и исследовать в реконструированном виде.

В серии обстоятельных работ Штримматтер с коллегами четко показал, что цитохром *b*₅-редуктаза и цитохром *b*₅ распределены в мембране случайным образом и взаимодействуют благодаря диффузии [1238, 1237]: эти два фермента диффундируют латерально по поверхности мембраны, а перенос электронов происходит только во время их случайных столкновений. Такой механизм реализуется как в реконструированных протеолипосомах [1238], так и в микросомной мембране [1237]. Диффузия, однако, не является лимитирующим процессом. В норме в системе имеется десятикратный избыток цитохрома *b*₅ над редуктазой. Такой избыток связанного с микросомной мембраной экзогенного цитохрома *b*₅ кинетически эквивалентен эндогенному пулу цитохромов *b*₅ [1237]. И цитохром *b*₅ (см. разд. 4.2.2), и цитохром *b*₅-редуктаза являются двухдоменными белками, в которых глобулярный растворимый домен связывает про-

стетическую группу (гем или флаavin), а единственный гидрофобный хвост закоривает белок в мембране. Гемсвязывающий и флавинсвязывающий домены сконструированы таким образом, чтобы облегчить перенос электрона от флавина к гему при взаимодействии этих белков [569]. Создана также реконструированная система, включающая десатуразу [391].

В более поздних исследованиях, однако, были получены серьезные указания на то, что часть цитохрома b_5 в микросомах не диффундирует свободно, а по крайней мере временно образует стехиометрические комплексы с цитохромами P450 [1427, 125, 1426] и, возможно, с NADPH-цитохром P450-редуктазой [1072, 1428]. Таким образом, цитохром b_5 играет важную роль в работе электронтранспортной цепи, включающей по крайней мере некоторые изоформы цитохрома P450 из микросом печени [1427].

Различные цитохромы P450 в микросомале печени окисляются целым рядом эндогенных липофильных субстратов, а также чужеродных молекул (ксенобиотиков). Если исходить из первичной структуры изоформ цитохромов P450, то эти белки должны иметь множество трансмембранных сегментов (см., например [1114], рис. 3.12), однако экспериментальные исследования показывают, что, по-видимому, ферменты закорены в микросомной мембране с помощью единственного трансмембранного спирального домена, расположенного ближе к N-концу полипептида [306]. NADPH-цитохром P450-редуктаза имеет близкую структуру с большим гидрофильным доменом, прикрепленным к мембране коротким гидрофобным хвостом [1072]. Чтобы объяснить, каким образом одна молекула редуктазы может «обслужить» столь большой избыток молекул P450, предложено два механизма. В одном постулируется существование стабильного кластера, представляющего собой молекулу редуктазы в окружении молекул цитохромов P450. Согласно второй модели, для переноса электронов необходимы свободная диффузия и столкновение ферментов [1435]. Получены некоторые данные о формировании в реконструированных фосфолипидных протеолипосомах эквимольярных комплексов цитохрома P450 и его редуктазы ([561, 771, 465]). Если такие комплексы действительно существуют в микросомной мембране [1428], то они, по-видимому, представляют собой временные образования, быстро распадающиеся и вновь образующиеся с участием других молекул P450. Лишь в таком варианте единственная молекула редуктазы может восстановить много молекул цитохромов. Окончательную картину еще предстоит выяснить, но уже ясно, что компоненты микросомной цепи нельзя считать изолированными. Для успешного функционирования системы, вероятно, существенными могут оказаться какие-то сложные варианты белок-белковых взаимодействий.

6.6.3. ДЫХАТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА МИТОХОНДРИЙ [568, 837, 1190, 1532]

Внутренняя мембрана митохондрий является местом, где осуществляется окислительное фосфорилирование. Суть процесса состоит в сопряжении потока электронов, направленного от органических субстратов к кислороду, с перемещением протонов из матрикса митохондрий через мембрану в межмембранное пространство. Как и предыдущие две электронтранспортные цепи, компоненты этой системы тоже представлены не в эквимоллярных количествах, т. е. дыхательная цепь не может функционировать как долгоживущий мультиферментный комплекс. Однако в данном случае число оборотов терминального фермента, цитохром с-оксидазы, весьма велико, а оценить, какая стадия (или стадии) является лимитирующей, в такой ситуации очень непросто [568, 837]. Цепь состоит из четырех трансмембранных мультисубъединичных комплексов, растворимого цитохрома с и убихинона-10 (см. рис. 6.5, 6.6). Перенос электронов через комплекс II (сукцинатдегидрогеназу) не сопровождается переносом протонов. Однако реакции, катализируемые комплексом I (NADH-дегидрогеназой), комплексом III (убихинол: цитохром с-оксидоредуктазой или bc_1 -комплексом) и комплексом IV (цитохром с-оксидазой), сопровождаются векторным переносом протонов через мембрану. Эти реакции являются электрогенными и приводят к генерации трансмембранного электрического потенциала. Такие ферменты в составе цепи называются «местами сопряжения». Относительно механизмов перемещения протонов пока нет единого мнения, хотя в литературе обсуждаются конкретные модели, в частности для комплексов III [1532] и IV [502]. Образующаяся трансмембранная разность электрохимических потенциалов протонов уменьшается за счет работы протонного канала АТФ-синтазы (или H^+ -АТФазы). Энергия потока используется этим ферментом для синтеза АТФ (гл. 8).

Концентрация компонентов дыхательных цепей в митохондриальной мембране довольно высока, однако существование эквимоллярных комплексов между образующими эти цепи мультисубъеди-

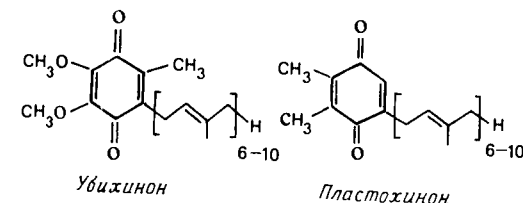


Рис. 6.6. Структурные формулы липофильных переносчиков водорода в дыхательной (убихинон) и фотосинтетической (пластохинон) электротранспортных цепях.

ническими ферментами нельзя считать доказанным [568]. В литературе обсуждаются модели электронного транспорта с участием таких переходных долгоживущих белковых агрегатов, однако имеющиеся кинетические данные можно объяснить, не предполагая образование таких суперкомплексов [568]. Цитохром *c* выполняет функцию челнока, быстро переносящего электроны между комплексами III и IV, аналогично аденодоксину в содержащей цитохром P450 системе митохондрий. При физиологической ионной силе цитохром *c* может диффундировать не только вдоль поверхности бислоя, но и в объеме раствора, что увеличивает его способность к быстрому переносу электронов [568]. Данная система обладает рядом особенностей, не характерных для описанных выше примеров электронтранспортных цепей.

1. Основные компоненты дыхательной цепи организованы в диссоциирующие комплексы. Например, комплекс III состоит из нескольких (от восьми до одиннадцати) субъединиц и содержит три гема и один железосерный центр. Перенос электронов между протетическими группами внутри каждого из компонентов происходит быстро и не требует их случайных столкновений.

2. Жирорастворимые переносчики водорода служат для переноса восстановительных эквивалентов не только между ферментами (от комплексов I и II к комплексу III), но и с одной стороны бислоя на другую. Показано, что убихинон обладает способностью к быстрой латеральной диффузии в плоскости мембраны, хотя вопрос о величине коэффициента диффузии не решен [568, 837]. В модельных системах убихинон также может переносить восстановительные эквиваленты через бислой [837]. Убихинон при перемещениях не выходит из мембраны, однако в ходе редокс-превращений он может захватывать или высвобождать протоны на границе раздела фаз липид—вода с любой стороны мембраны. Кинетические свойства изолированных ферментов, использующих убихинон (или его восстановленную форму убихинол) в качестве субстрата, можно с успехом анализировать, используя уравнения Михаэлиса — Ментен с соответствующими значениями K_m и V_{max} , если известна реальная концентрация хинона в бислое [837]. Иное дело, если мы рассматриваем стационарную кинетику систем, в которых одна популяция ферментов (комплексы I и II) сопряжена с другой (комплекс III) посредством свободно диффундирующего пула хинонов как интермедиатов. Для описания подобных систем приходится применять специальные уравнения [114]. Тот факт, что компоненты дыхательной цепи связаны через свободно диффундирующий пул хинонов, не вызывает сомнений, но в вопросе, является ли диффузия хинона лимитирующей стадией в работе электронтранспортной цепи, единого мнения среди исследователей нет [568, 837].

3. Протоны, перенесенные через мембрану при работе дыхатель-

ной цепи, возвращаются обратно с помощью АТР-синтазы, замыкая тем самым протонный цикл. Механизм, по которому протоны переносятся от компонентов электронтранспортной цепи к АТР-синтазе, тоже до конца не установлен, и этот вопрос вряд ли будет разрешен в ближайшем будущем (см. обзор [419]). Большинство исследователей считают, что протоны, переносимые через бислой, быстро приходят в равновесие со всей водной фазой. Согласно другой точке зрения, существует локализованный протонный поток и протоны переносятся либо вдоль поверхности бислоя [1174], либо внутри бислоя, либо прямо на АТР-синтазу [1256]. Большинство данных в пользу этого механизма носят косвенный характер [419], но в литературе имеются свидетельства быстрого перемещения протонов вдоль поверхности фосфолипидного монослоя в нефизиологических условиях. Возможно, при некоторых обстоятельствах такой локализованный протонный поток имеет какое-то значение ([1174]; разд. 7.5.1).

Таким образом, данная электронтранспортная система представляет собой совокупность небольшого числа высокоорганизованных комплексов, связанных между собой низкомолекулярными подвижными переносчиками, как липофильными (хинон), так и водорастворимыми (цитохром *c*). Кинетику переноса электронов можно объяснить в рамках модели свободно диффундирующих форм, которые могут перемещаться вдоль мембраны на расстояние более 100 Å.

6.6.4. ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНАЯ СИСТЕМА ТИЛАКОИДОВ [534, 1573, 1042]

Фотосинтетическая электронтранспортная цепь имеет много общего с дыхательной цепью митохондрий, но обладает дополнительным уровнем сложности. Как можно видеть из рис. 6.5, фотосинтетическая электронтранспортная система содержит три больших многосубъединичных трансмембранных комплекса: реакционные центры фотосистемы I и фотосистемы II и b_6/f -цитохромный комплекс. Кроме того, в состав цепи входят небольшие водорастворимые белки пластоцианин и ферредоксин, а также периферический белок ферредоксин-NADP⁺-оксидоредуктаза и мембраносвязанный переносчик водорода пластохинон (рис. 6.6). К фотосинтетической электронтранспортной системе можно также отнести светособирающие комплексы, поглощающие свет и передающие энергию электронного возбуждения на два реакционных центра. Захват энергии возбуждения реакционными центрами приводит к разделению зарядов и образованию на противоположных сторонах мембраны сильного окислителя и сильного восстановителя. Это в свою очередь ведет к окислению воды до молекулярного кислорода фотосисте-

мой II и создает движущую силу для транспорта электронов по цепи, сопряженного с трансмембранным переносом протонов. Образующийся на бислое градиент электрохимических потенциалов протонов используется для синтеза АТФ с помощью АТФ-синтазы, называемой сопрягающим фактором. Структура фотосистемы II, по-видимому, очень похожа на структуру бактериального фотореакционного центра, которая была детально изучена методом рентгеноструктурного анализа (гл. 3). b_6f -Комплекс аналогичен комплексу III (b_6f -комплексу) дыхательной цепи митохондрий, а сопрягающий фактор — митохондриальной АТФ-синтазе. Роль пластоцианина очень напоминает роль цитохрома c в дыхательной цепи, являющегося растворимым переносчиком электронов, а пластохинон представляет собой полный аналог убихинона в электронтранспортной системе митохондрий.

В отличие от дыхательной цепи основные мембранные комплексы представлены в фотосинтетической системе примерно в эквимоллярном соотношении [1573] (см. рис. 6.5). Однако какие-либо серьезные указания в литературе на формирование суперкомплексов отсутствуют. Напротив, для данной системы характерна поразительная латеральная гетерогенность, в результате которой фотосистема II оказывается локализованной в гранальных, плотно упакованных участках, а фотосистема I и сопрягающий фактор — в стромальных участках тилакоида (см. разд. 4.5.2). Пластохинон и b_6f -комплекс, по-видимому, распределены между этими участками равномерно. Вследствие такого латерального разделения для сопряжения двух фотосистем необходима диффузия на расстояние по крайней мере 1000 Å. Скорее всего основным переносчиком восстановительных эквивалентов на такие расстояния является пластохинон, хотя скорость его латеральной диффузии точно не известна. В оптимальных условиях лимитирующей стадией, вероятно, является окисление пластохинона b_6f -комплексом, однако связано ли это со скоростью его латеральной диффузии или с работой самого фермента — неясно.

Латеральное разделение компонентов цепи в тилакоидах явно не способствует ускорению переноса электронов между ферментами. Возможно, оно необходимо для эффективного перераспределения световой энергии между двумя фотосистемами [534]. Фосфорилирование белка светособирающего комплекса II приводит к его перераспределению между гранальными и стромальными участками мембраны, облегчая его взаимодействие с фотосистемой I в стромальных участках, что в свою очередь увеличивает долю энергии возбуждения, поступающей на реакционные центры фотосистемы I.

6.7. Взаимодействия между мембранными и растворимыми ферментами

Биомембраны играют важную роль в функционировании целого ряда растворимых ферментов. После разрушения клетки многие ферменты можно обнаружить и в растворимой, и в мембранной фракциях. Отнесение некоего фермента к классу периферических мембранных белков зависит от силы его взаимодействия с мембраной и способа выделения. Кроме того, некоторые растворимые ферменты в специфических условиях связываются с мембраной, и, следовательно, в зависимости от физиологического состояния клетки локализуются либо на мембране, либо в цитозоле. Кроме того, существует группа растворимых ферментов, катализирующих реакции с участием мембраносвязанных субстратов. Для функционирования такие белки должны быть способны хотя бы временно связываться с мембраной.

Во всех этих случаях мембрана выполняет следующие функции: 1) определяет локализацию или компартментацию фермента или группы ферментов; 2) осуществляет аллостерическую активацию или инактивацию ферментов в определенных условиях или в определенной области в клетке; 3) создает среду, в которой липофильные субстраты могут быть превращены в соответствующие продукты.

6.7.1. РАСТВОРИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ, КОТОРЫЕ ПРИ НЕОБХОДИМОСТИ МОГУТ СВЯЗЫВАТЬСЯ С МЕМБРАНОЙ

Пока эта важная группа насчитывает небольшое число ферментов, но, по-видимому, в недалеком будущем их список увеличится. Наиболее характерный пример — протеинкиназа C, хотя и другие представители этой группы неплохо охарактеризованы.

Протеинкиназа C [1071, 80, 1121]

Это ключевой фермент системы передачи сигнала, запускаемого быстрым расщеплением фосфатидилинозитолов в плазматической мембране (см. разд. 9.7.3). Такие внеклеточные вещества, как нейромедиаторы, гормоны или факторы роста, связываются со специфическими рецепторами на поверхности клетки. Это приводит к активации фосфолипазы C, которая начинает гидролизовать фосфатидилинозитолы с образованием вторых посредников. Один из продуктов гидролиза, инозитол-1,4,5-трифосфат, вызывает увеличение концентрации свободного кальция внутри клетки. Второй продукт, *sn*-1,2-диацилглицерол, активирует протеинкиназу C, что в свою очередь приводит к фосфорилированию целого ряда белков-

мишеней, многие из которых, например рецептор фактора роста эпидермиса, являются мембраносвязанными. Согласно современным представлениям, данная система участвует в осуществлении целого ряда клеточных функций, в частности в делении, дифференцировке и экзцитозе.

До активации клетки какими-либо экзогенными агентами протеинкиназа С остается неактивной и обнаруживается только в цитозоле. Однако после стимуляции клетки фермент быстро активируется и оказывается в мембранных фракциях. Исследования *in vitro* показали, что для связывания с мембраной и активации необходимы кислые фосфолипиды (например, фосфатидилсерин), а также Ca^{2+} и диацилглицерол. Специфичность к фосфолипиду, необходимому для активации, до некоторой степени зависит от природы субстрата [76]. Для активации фосфотрансферазной активности фермента можно добавить прямо к клеткам проникающие через мембрану короткоцепочечные диацилглицеролы, например диоктаноилглицерол [80]. Природные вторые посредники, длинноцепочечные диацилглицеролы, нерастворимы в воде и остаются в мембране. Аналогичное действие оказывают, по-видимому, промоторы опухолевого роста форболовые эфиры (рис. 9.17): как показано, они способны связываться с ферментом и вызывать те же изменения, что и эндогенный сигнал. После связывания форболовых эфиров или диацилглицеролов возрастает сродство фермента к Ca^{2+} и фосфатидилсерину. Показано, что эффективным конкурентным ингибитором фермента является сфингозин [585].

На самом деле протеинкиназа С представлена несколькими разными, но близкими по структуре полипептидами с мол. массой ~ 80 000. Например, из мозга кролика выделено три формы [699]. Протеинкиназа С имеет двухдоменную структуру [1121]. Один домен содержит каталитические центры, связывающие АТФ и белок-субстрат, и функционирует как сериновая и треониновая фосфотрансфераза. Второй домен, по-видимому, участвует в связывании фосфатидилсерина, диацилглицерола и Ca^{2+} . С помощью мягкого протеолиза можно разделить два этих домена, получив полностью активный каталитический фрагмент с мол. массой ~ 50 000. Таким образом, активировать фермент можно двумя взаимоисключающими способами: протеолизом и связыванием с мембраной. Таким же образом ведут себя и некоторые другие липидзависимые ферменты, например пируватоксидаза (см. разд. 6.5). Физиологическое значение протеолитической активации неясно.

Очищенный фермент был встроен в фосфолипидные везикулы [1361] и в смешанные везикулы, содержащие тритон X-100 и фосфолипиды [588]. В обоих случаях было показано, что само по себе связывание липида ферментом необходимо, но не достаточно для проявления ферментативной активности. Например, для связыва-

ния фермента с фосфолипидными везикулами достаточно 2% фосфатидилсерина, в то время как для оптимального фосфорилирования его необходимо уже 50% [1361]. В норме содержание фосфатидилсерина в плазматической мембране составляет 8—10% [588]. Поскольку фермент активируется в смешанных мицеллах, содержащих примерно 20 мол. % фосфатидилсерина в тритоне X-100, наличие бислойной структуры не является необходимым, что, вообще говоря, весьма типично для липидзависимых ферментов. Зависимость наблюдаемой активации от концентрации фосфатидилсерина свидетельствует о кооперативном характере взаимодействий фермента и липида, что также довольно обычно (см. разд. 6.4). По оценкам [80, 588] функционально активный фермент представляет собой комплекс, содержащий мономер фермента, одну молекулу диацилглицерола (или форболового эфира), один или более ионов Ca^{2+} и по крайней мере четыре молекулы фосфатидилсерина. Связывание всегда происходит с поверхностью мембраны, но роль Ca^{2+} неизвестна. Он может, например, хелатировать карбоксильные группы фосфатидилсерина и какие-то группы в белке и/или играть роль аллостерического регулятора при связывании белка. Тот факт, что фермент может быть помечен иодонафталин-1-азидом (см. табл. 4.1), служит указанием на некоторое проникновение белка в гидрофобную зону бислоя [1361], но не более того.

Дополнение 6.2. Эффект поверхностного разведения в смешанных мицеллах

Рис. 6.7 иллюстрирует интересную особенность протеинкиназы С и других мембранных ферментов, выявляемую при измерении их активности в системах со смешанными мицеллами. В этом эксперименте измеряли зависимость способности фермента связывать форболовый эфир от концентрации тритона X-100. Если поддерживать постоянным содержание фосфатидилсерина в мольных процентах, а концентрацию тритона X-100 увеличивать, то фермент будет связывать форболовый эфир даже при высокой концентрации детергента. Однако если поддерживать постоянной объемную концентрацию фосфолипида и увеличивать количество детергента, то фермент перестанет связывать форболовый эфир при высоких концентрациях тритона X-100. Для активации фермента важна не объемная, а поверхностная концентрация липида, иными словами, число молекул липида на мицеллу. Если эта величина падает, то уменьшаются также способность фермента связываться с такими смешанными мицеллами и способность активироваться. Это явление называется явлением поверхностного разведения.

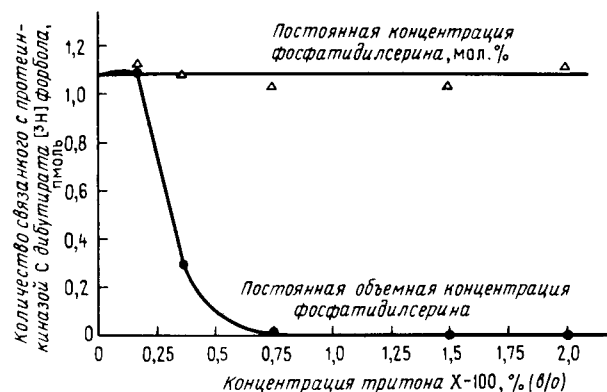


Рис. 6.7. Влияние поверхностного разведения активизирующего липидного компонента на мембранный фермент [588]. Измеряли связывание форболового эфира с протеинкиназой С в смешанных мицеллах, для которого необходим фосфатидилсерин. В одном эксперименте поддерживали постоянным (16 мол. %) отношение фосфатидилсерина к детергенту (тритону X-100). Увеличение концентрации тритона X-100 не влияло на связывание форболового эфира. В другом эксперименте поддерживали постоянным количество фосфатидилсерина (16 мол. %), при этом содержание тритона X-100 оставалось постоянным (0,2%). Увеличение концентрации детергента приводит к увеличению количества мицелл и соответственно к уменьшению концентрации в них фосфолипида. Вследствие такого поверхностного разведения происходит ухудшение связывания форболового эфира с ферментом.

Другие примеры

Лимитирующей стадией биосинтеза фосфатидилхолина является синтез интермедиата CDP-холина. Фермент, катализирующий эту реакцию, называется CDP:фосфохолин цитидилтрансферазой. Он содержится в цитозоле, но, как было недавно показано, может связываться с эндоплазматическим ретикуломом, где происходит его активация [1499, 1609, 244]. Именно в месте связывания осуществляется биосинтез фосфатидилхолина (см. разд. 10.4). Отметим, что оба субстрата растворимы в воде и не связаны с мембраной. Что заставляет фермент связываться с мембраной, пока неясно. Возможно, сигналом служит появление в мембране диацилглицеролов. Рассматриваются также следующие механизмы: 1) увеличение содержания длинноцепочечных жирных кислот или ацильных производных CoA [244]; 2) истощение микросомной мембраны по фосфатидилхолину; 3) дефосфорилирование самого фермента, в результате чего он переходит в мембраносвязанную активную конформацию. Для установления истинного механизма необходимы дальнейшие исследования.

Показано, что в зависимости от содержания мембраносвязанных диацилглицеролов фермент диацилглицеролкиназа может перемещаться из цитозоля в мембрану [95]. Он катализирует превращение диацилглицерола в фосфатидную кислоту и по крайней мере частично ответствен за утилизацию диацилглицерола в мембране. Диацилглицерол и жирные кислоты участвуют также в связывании α -актинина с мембранами [169]. Полагают, что определенную роль в прикреплении пучков микрофиламентов к плазматической мембране играет и диацилглицеролкиназа. Возможно, индуцируемое диацилглицеролом и жирными кислотами образование комплексов α -актинина и актина является важным элементом физиологической активности тромбоцитов.

Остановимся вкратце еще на двух ферментах, которые в определенных условиях связываются с биомембранами: пируватоксидазе и фосфатидилсеринсинтетазе из *E. coli*. В присутствии субстрата оба фермента перемещаются из цитозоля в цитоплазматическую мембрану. Пируватоксидаза уже упоминалась как пример липидзависимого фермента (разд. 6.5). В присутствии пирувата, восстанавливающего связанный с белком флавиновый кофактор, фермент по своим свойствам (в частности, растворимости) становится классическим мембранным белком. Он восстанавливает растворенный в мембране убихинон и поэтому для своего функционирования должен быть связан с мембраной. В норме при очистке фосфатидилсеринсинтазы она выделяется в связанном с рибосомами виде, но в присутствии либо субстрата (CDP-диацилглицерола), либо продукта (фосфатидилсерина) оказывается связанной с мембраной [874].

6.7.2. РАСТВОРИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ ИЛИ ФЕРМЕНТНЫЕ АНСАМБЛИ, КОТОРЫЕ IN VIVO МОГУТ БЫТЬ АССОЦИИРОВАНЫ С МЕМБРАНОЙ [934, 1374]

В литературе все чаще появляются данные о возможной ассоциации целого ряда растворимых ферментов с мембраной. Большинство работ посвящено связыванию ферментов цикла трикарбоновых кислот [144] и β -окисления жирных кислот [1407] с внутренней митохондриальной мембраной и ферментов гликолиза с плазматической мембраной эритроцитов. Приводятся доказательства, хотя и не вполне убедительные, что ферменты митохондриального матрикса организованы в связанные с поверхностью мембраны мультиферментные комплексы [934, 1374]. В некоторых случаях удалось выявить специфические центры связывания. Например, NAD^+ -зависимые дегидрогеназы (пируватдегидрогеназный комплекс и др.) образуют комплексы с NADH: убихинон оксидоредуктазой (комплексом I) [1406, 1170]. Креатинфосфокиназа специфически связывается с кардиолипином во внутренней митохондриальной мембране

[1035]; гексокиназа также связывается с митохондриями — возможно, с их наружной мембраной [1517, 1055]. Распределение гексокиназы между растворенной и связанной с митохондриями формами, по-видимому, модулируется гормонами или метаболитами [1517]. Во всех этих случаях смысл ассоциации перечисленных ферментов, а возможно, и других растворимых ферментов с мембраной, состоит в «канализации» субстрата (см. обзор [1375]). Например, переносимый через внутреннюю митохондриальную мембрану АТФ должен более эффективно утилизироваться гексокиназой, локализованной около мембраны. Однако это предположение пока нельзя считать окончательно доказанным.

В ряде работ показано, что гликолитические ферменты связываются с экспонированным в цитоплазму кислым доменом белка полисомы 3 (анионного переносчика) мембраны эритроцитов [876]. В число этих ферментов входят альдолаза [705], фосфофруктокиназа [705, 706], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа [1215]. Предполагается, что в некоторых случаях связанный с мембраной фермент может оставаться в неактивной форме и быстро переходить в активную цитоплазматическую форму в присутствии соответствующих метаболитов [705]. Пока неясно, правда, происходит ли такая ассоциация *in vivo* или это артефакт, связанный с работой *in vitro*. Взаимодействия между белками в таких ассоциатах относительно слабые и зависят от ионной силы. Такая же картина характерна для некоторых предполагаемых ассоциатов ферментов с митохондриальной мембраной [144]. Однако сопряжение гликолитических функций с мембранными активностями и компартментализация этих ферментов, вообще говоря, слишком привлекательная концепция, чтобы ее отбрасывать, тем более что для других систем существование таких ассоциатов доказано [1156].

Получить убедительные доказательства физиологической значимости взаимодействия этих ферментов и ферментных ансамблей с мембраной довольно трудно, но есть основания полагать, что в недалеком будущем в этой области исследований будет достигнут определенный прогресс.

Еще один класс взаимодействующих с мембраной растворимых белков представляют цитотоксины. В разд. 8.6.1 эти агенты и их каналообразующая активность будут рассмотрены более детально.

6.7.3. ФАКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ — ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ФЕРМЕНТЫ, АКТИВИРУЕМЫЕ СВЯЗЫВАНИЕМ С МЕМБРАНОЙ

Свертывание крови происходит в результате сложного каскада реакций с участием целого ряда факторов сыворотки. В ходе этих реакций осуществляется последовательная протеолитическая активация

серии зимогенов, каждый из которых, активировавшись, в свою очередь вызывает активацию одного или нескольких других зимогенов. Конечным результатом всех этих реакций является превращение фибриногена в фибрин. Для осуществления многих этапов этого каскада необходимо, чтобы активированная протеаза и/или субстрат-зимоген связалась с мембраной тромбоцитов, эндотелиальных или иных клеток. Особый интерес представляют следующие вопросы: 1) как белки связываются с мембранами? 2) какую роль играет мембрана в активации участвующих в свертывании крови ферментов? Окончательных ответов на эти вопросы пока нет.

Всем связывающимся с мембранами факторам свертывания крови необходимы кислые фосфолипиды. Некоторые из них, в частности факторы VII, IX, X и протромбин, требуют также Ca^{2+} . С участием витамина К происходит модификация этих четырех белков — карбоксилирование в γ -положении остатков глутамата, локализованных в гомологичных N-концевых участках каждого из полипептидов. В результате такой модификации в молекуле белка формируется значительное число высокоаффинных центров связывания Ca^{2+} , который в свою очередь необходим для соответствующего взаимодействия белков с кислыми фосфолипидами (например, фосфатидилсерин) на мембране [1018]. Каким образом Ca^{2+} облегчает белково-мембранные взаимодействия, не совсем ясно. Это может быть, в частности, «сшивание» с помощью Ca^{2+} белка с гидрофильными отрицательно заряженными головками фосфолипида. Кальций необходим не для всех факторов свертывания крови. Так, фактор V может непосредственно взаимодействовать с отрицательно заряженными фосфолипидами [684], а другой компонент, так называемый «тканевый фактор», вообще является интегральным мембранным белком [449]. Большей частью, однако, факторы взаимодействуют с поверхностью бислоя за счет электростатических сил, хотя иногда наблюдается и некоторое проникновение белка в гидрофобную область мембраны [827, 787].

Присутствие фосфолипидов сильно меняет стационарную кинетику реакций протеолитической активации [577]. Резко уменьшается значение K_M для белкового субстрата; например, для реакции активации фактора X фактором IXa («a» означает активированную форму) K_M изменяется от 181 до 0,058 мкМ. Добавление другого белка, фактора VIIa, увеличивает $V_{\max}$ более чем в 200 000 раз. Поскольку реакция катализируется обоими ферментами, а субстрат в данных условиях измерения представлен как мембраносвязанный, так и свободной формами, истинный механизм влияния липида в таких реакциях определить чрезвычайно сложно. Например, показано, что протеолитическая активность фактора X увеличивается при связывании его с мембраной, в то время как фактор IX одинаково активен в свободном и в мембраносвязанном состояниях [974]. Фактор

Х можно также активировать комплексом фактора VIIa и тканевого фактора. В этом случае протеолитическая активация фактора Х происходит, только когда он находится в свободной форме в растворе и не связан с мембраной [449]. Другой пример — активация протромбина фактором Ха [1496, 699]. Наблюдаемое в этом случае низкое значение K_M коррелирует с концентрацией субстрата и протромбина на поверхности фосфолипидной везикулы. Если же добавить кофактор — фактор Va, образующий с фактором Ха комплекс, — то всякая зависимость K_M от поверхностной концентрации протромбина на везикуле исчезнет [1496]. В заключение отметим, что данная система очень сложна, и роль липидов здесь отнюдь не сводится лишь к созданию соответствующей поверхности, на которой происходит простое концентрирование компонентов системы.

Факторы свертывания крови входят в группу Ca^{2+} -зависимых липидсвязывающих белков [1561]. Функции этих белков не всегда бывают известны [1561]; некоторые из них связаны с цитоскелетом [369]. Фосфолипазы, к рассмотрению которых мы сейчас перейдем, также являются Ca^{2+} -зависимыми ферментами.

6.7.4. ФОСФОЛИПАЗЫ — РАСТВОРИМЫЕ ФЕРМЕНТЫ, КАТАЛИЗИРУЮЩИЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ СУБСТРАТОВ [324, 1486]

Фосфолипиды служат субстратами многих растворимых ферментов, в том числе фосфолипаз. Среди них лучше всего изучена фосфолипаза A_2 , которая катализирует гидролиз фосфолипидов по положению *sn*-2 с образованием жирной кислоты и лизофосфолипида (см. рис. 4.3). Фосфолипаза A_2 была выделена сначала из ядов кобры и гремучей змеи, а затем из поджелудочной железы быка и свиньи. Это очень близкие по первичной структуре небольшие белки с мол. массой около 14 000. Для некоторых ферментов удалось получить с высоким разрешением трехмерные структуры, также обладающие высокой степенью гомологии [1210]. Ферменты из поджелудочной железы синтезируются как неактивные зимогены, которые затем активируются протеолизом: от зимогена отщепляется семь остатков с С-конца.

Фосфолипаза A_2 представляет особый интерес с точки зрения мембранной энзимологии, поскольку она обладает способностью активироваться при взаимодействии с интегрированными формами субстрата, например с мицеллами или бислоем. На рис. 6.8 представлена зависимость от концентрации субстрата скорости гидролиза короткоцепочечного фосфатидилхолина фосфолипазой A_2 и его предшественником из поджелудочной железы свиньи. Данный субстрат в концентрациях до 1,5 мМ является мономером, но при

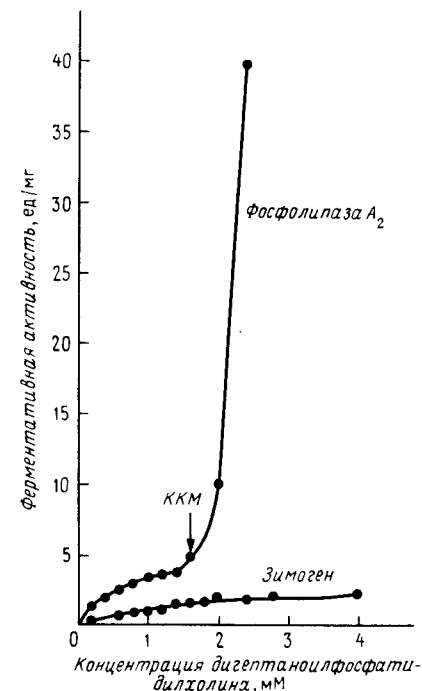


Рис. 6.8. Зависимость активности фосфолипазы A_2 и ее зимогена от концентрации короткоцепочечного фосфатидилхолина [1157]. Обратите внимание на резкое увеличение специфической активности при концентрации липида выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ). (Воспроизведено с разрешения Американского химического общества из журнала *Biochemistry*, 1974, vol. 13, p. 1456.)

дальнейшем увеличении концентрации формирует мицеллы. И зимоген, и активированный фермент очень медленно гидролизуют субстрат в мономерной форме, но как только фосфолипид начинает образовывать мицеллы, активность фосфолипазы A_2 резко возрастает.

Активации фосфолипазы агрегированными субстратами было посвящено множество работ, в которых исследовалась кинетика катализируемого ферментом гидролиза субстратов в мономерной форме, в чистых липидных мицеллах, в смешанных мицеллах с тритоном X-100, в монослоях на поверхности раздела воздух—вода и в фосфолипидных везикулах. Для проявления каталитической активности ферменту во всех случаях нужен Ca^{2+} , причем центр связывания единственного иона Ca^{2+} можно выявить с помощью

рентгеноструктурного анализа. В отличие от факторов свертывания крови фосфолипаза A_2 не содержит остатка γ -карбоксиглутаминовой кислоты и для ее активации не требуются кислые фосфолипиды.

Дополнение 6.3. Для объяснения механизма активации фосфолипаз предложено несколько гипотез

В ряде работ было показано, что связывание фермента с мицеллами или бислоями предшествует стадии активации, при которой резко возрастает число оборотов фермента, и экспериментально эти две стадии можно разделить [967]. Такое поведение ничем не отличается от поведения других рассмотренных в этой главе липидзависимых ферментов. Несмотря на обилие данных по кинетике, связыванию и структуре фосфолипазы, исследователи не пришли к единому мнению о том, что происходит с ферментом при его активации в присутствии липидного бислоя или мицелл. В литературе рассматривается несколько возможных механизмов.

1. Фермент связывается с бислоем с помощью специального «участка узнавания поверхности раздела», отличного от активного центра, и для его формирования необходим Ca^{2+} . Предполагается, что этот участок проникает в глубь мембраны. Эта модель основана, в частности, на данных по специфическому влиянию химической модификации N-концевого участка полипептида на взаимодействие с агрегированными субстратами [335, 697]. Происходящая при взаимодействии участка узнавания с мембраной активация фермента, по-видимому, обусловлена конформационными изменениями белка. Следует отметить, что в кристаллическом виде ферменты из поджелудочной железы быка и свиньи представляют собой мономеры, в то время как фосфолипаза A_2 из яда гремучей змеи является димером [1210]. Обнаруживаемый в мономерных фосфолипазах участок, который, как предполагают, является «участком узнавания поверхности», в димерном ферменте недоступен из водной фазы и находится на поверхности межсубъединичного контакта [1210].

2. Двухфосфолипидная модель предполагает существование в ферменте двух или более центров связывания фосфолипидов и основана прежде всего на кинетических данных по активации фермента фосфолипидами в смешанных мицеллах. Эта модель позволяет учесть роль агрегации двух или более молекул фермента как важнейшей части схемы активации [967], а также роль возможных конформационных изменений в увеличении каталитической активности.

3. Постулируется, что конформация фосфолипидного субстрата в агрегированном состоянии отличается от конформации мономер-

ной формы, и именно с этим связана более высокая скорость гидролиза агрегированных форм липидов ферментом.

4. Увеличение активности связано с тем, что из мицелл или бислоя продукты гидролиза удаляются легче. Кроме того, само по себе накопление продуктов уже приводит к увеличению активности фосфолипазы A_2 , хотя механизм этого явления неясен.

Одна из проблем, возникающих при анализе процесса активации, состоит в том, как разделить процессы связывания с липидом и активацию липидом. В экспериментах с однослойными фосфолипидными везикулами удалось выяснить, что критическим параметром для обеих стадий является физическое состояние бислоя. Показано, например, что фосфолипаза A_2 лучше всего связывается с дипальмитоилфосфатидилхолином в фазе геля [967, 854], причем Ca^{2+} для этого не нужен. Для активации же фермента в такой системе, по-видимому, требуется Ca^{2+} , причем в случае везикул фосфатидилхолиновый бислой должен обладать дефектами упаковки и в нем должны происходить структурные флуктуации, подобные тем, которые имеют место в ходе термоиндуцируемого фазового перехода [967, 854]. Взаимодействия молекул белков (например, димеризация) могут быть важны как для связывания, так и для активации. В некоторых условиях активированный фермент сохраняет активность по крайней мере в течение 30 мин [967].

Лучшими субстратами для фермента являются фосфолипиды с короткой ацильной цепью и небольшими по объему полярными заместителями при фосфате [697]. Хотя для активации фермента кислые фосфолипиды не являются необходимыми, отрицательный заряд на поверхности раздела все же повышает сродство к субстрату [695]. Связавшись с границей раздела, фермент может латерально перемещаться по поверхности бислоя и гидролизовать до нескольких тысяч фосфолипидных молекул в минуту до тех пор, пока не отделится от бислоя [695, 696]. Время пребывания белка на поверхности бислоя в значительной степени зависит от природы липида и свойств окружающего раствора.

Какие именно конформационные изменения приводят к активации и каким способом происходит связывание фермента с бислоем, неизвестно. Обнаруживаемая при изучении модельных бислоев систем зависимость кинетики от наличия дефектов бислоя [1489] представляется очень интересной, хотя неясно, насколько такие дефекты важны для работы фермента *in vivo*.

И в заключение необходимо отметить, что фосфолипаза A_2 ответственна за высвобождение из мембраны арахидоновой кислоты, последующее превращение которой в лейкотриены и простагландины является частью воспалительного процесса [661]. Стероиды, об-

ладающие противовоспалительным эффектом, активируют группу белков, называемых липокортинами, которые в свою очередь специфически ингибируют фосфолипазу A_2 . Липокортины являются также субстратами протеинкиназы C и тирозиновых протеинкиназ, которые, вероятно, могут таким образом участвовать в регуляции активности липокортинов [661, 155]. Ингибирующий эффект липокортинов, по-видимому, связан не с образованием прочного комплекса с фосфолипазой A_2 , а с их взаимодействием непосредственно с мембраной [155, 286]. Таким образом, липокортины могут быть отнесены к классу Ca^{2+} -регулируемых мембраносвязанных белков [499, 920].

6.8. Резюме

Многие клеточные процессы катализируются мембраносвязанными ферментами. При этом мембрана может выполнять целый ряд функций. Связав фермент с определенной мембраной или участком на мембране, можно локализовать каталитический центр в определенной части клетки. Существует множество примеров, когда несколько действующих последовательно ферментов организованы подобным образом в некий суперкомплекс, что позволяет увеличить суммарную скорость реакции. Многие мембранные ферменты представляют собой белки, пронизывающие мембрану насквозь, и участвуют в трансмембранном транспорте растворенных веществ или в передаче информации с одной стороны бислоя на другую в форме трансмембранного аллостерического сигнала. Другие ферменты являются периферическими мембранными белками и в некоторых случаях способны связываться с мембраной только в ответ на определенный физиологический сигнал.

Во многих случаях липидный бислой играет пассивную роль в функционировании мембраносвязанных ферментов, являясь лишь средой, в которой происходит взаимодействие фермента с субстратом. Нередко, однако, оптимальное функционирование мембранных ферментов оказывается возможным только в присутствии определенных липидов, хотя абсолютная специфичность конкретного липида в активации фермента встречается крайне редко. Интерпретировать данные по влиянию липидов на активность изолированных мембранных ферментов часто очень непросто. Изучение очищенных мембранных белков *in vitro* ставит перед исследователем огромное множество совершенно особых проблем, не встречающихся при работе с растворимыми ферментами.

Глава 7

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С МЕМБРАНАМИ: ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ, ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

7.1. Введение

В начале предыдущей главы мы отмечали, что биомембрана — это не просто пассивный барьер, разграничивающий клетки или органеллы и препятствующий свободному переносу растворенных веществ между водными компартментами. В этой главе мы остановимся именно на функции мембраны как барьера. Основной акцент будет сделан на взаимодействии между фосфолипидным бислоем и растворенными в окружающей его водной среде низкомолекулярными соединениями — как ионами, так и неэлектролитами. Вначале мы обсудим связывание таких молекул с мембраной, причем под связыванием будем понимать как адсорбцию на поверхности, так и проникновение внутрь бислоя (растворение). Любое попавшее в бислой вещество может диффундировать через него и выйти с противоположной стороны. В этих рамках здесь обсуждается проблема проницаемости мембраны для неэлектролитов. Чтобы понять, каков механизм взаимодействия ионов с мембраной, необходимо рассмотреть общий профиль электрической составляющей потенциальной энергии мембраны. Знание электрической составляющей свободной энергии иона, находящегося вблизи мембраны или внутри нее, чрезвычайно важно не только для понимания того, как связываются с поверхностью мембраны ионы двух- или одновалентных металлов, но и для оценки локальных значений pH на поверхности мембраны, а также для моделирования механизмов регуляции ферментов и ионных каналов с помощью изменения электрического напряжения на бислой.

Если в данной главе в основном описываются свойства липидного бислоя, то гл. 8 посвящена уже катализируемому белками транспорту растворенных веществ через мембрану.

7.1.1. АНАЛИЗ АДСОРБЦИИ ЛИГАНДОВ НА БИСЛОЕ

Перед тем как приступить к изложению материала, обсудим, каким образом можно описать адсорбцию лигандов на поверхности бислоя. Необходимость такого описания возникает при анализе

многочисленных экспериментальных ситуаций, при этом можно использовать несколько подходов. Здесь мы подробно рассмотрим адсорбцию на бислое ионов и амфифильных молекул, хотя такой же анализ применим для любых молекул, способных связываться с поверхностью бислоя. В связывании низкомолекулярных соединений с белками обычно участвуют вполне определенные специфические центры (например, АТР-связывающие центры АТРазы). Изучая связывание молекул с белком, можно определить 1) число центров связывания на молекуле белка; 2) сродство центра связывания к лиганду; 3) степень взаимодействия между центрами связывания, т. е. кооперативность. Экспериментально все эти характеристики можно получить из анализа кривой связывания (или изотермы адсорбции), т. е. зависимости количества связанного лиганда (например, АТР) от концентрации свободного (или несвязанного) лиганда. Анализ такой зависимости относительно несложен, поскольку имеется лишь фиксированное число центров связывания, которые могут быть либо заняты, либо свободны. Такой же подход применим при изучении связывания каких-либо лигандов с определенным центром на мембране (например, связывания гормона с рецептором).

Анализ адсорбции молекул на поверхности липидного бислоя, однако, гораздо более сложен, поскольку в этом случае понятие центра связывания не столь однозначно. Подход, который следует использовать в этом случае, и информация, которую можно получить, зависят от конкретной экспериментальной ситуации. Рассмотрим несколько таких подходов.

Равновесное распределение

Данная модель рассматривает мембрану как отдельную фазу. Небольшие молекулы распределяются между водной фазой и мембраной в соответствии с коэффициентом распределения K_p ,

$$K_p = C_{\text{связ}} / C_{\text{своб}}, \quad (7.1)$$

где $C_{\text{связ}}$ и $C_{\text{своб}}$ — концентрации связанного с мембраной и свободного лиганда соответственно. В такой модели насыщение отсутствует, т. е. концентрация связанного лиганда будет расти до бесконечности с увеличением его концентрации в водной фазе. Естественно, это нереальная ситуация, и данная модель применима только в том случае, если количество связанного лиганда относительно мало. Отметим, что в данной модели не содержится никакой информации о центрах связывания. При концентрациях лиганда, далеких от насыщения, т. е. в условиях, когда заполнена лишь небольшая доля потенциальных центров связывания, практически любое уравнение адсорбции сводится к уравнению (7.1).

Коэффициент распределения можно выразить несколькими способами. Проще всего представить концентрацию связанного лиганда как поверхностную концентрацию $N_{\text{связ}}$, имеющую размерность моль/см², и тогда коэффициент распределения β имеет размерность длины (см):

$$\beta = \frac{N_{\text{связ}} \text{ (моль/см}^2\text{)}}{C_{\text{своб}} \text{ (моль/см}^3\text{)}}. \quad (7.2)$$

Если $N_{\text{связ}}$ разделить на толщину мембраны δ , то полученная объемная концентрация лиганда в мембране будет иметь размерность моль/объем, где объем соответствует объему бислоя или той его части, где локализовано растворенное вещество:

$$C_{\text{связ}} = N_{\text{связ}} / \delta, \text{ так что } K_p = \beta / \delta.$$

В литературе используют оба типа коэффициентов распределения [439].

Изотерма адсорбции Лэнгмюра

В этой модели мембрана рассматривается как регулярная решетка из потенциальных центров связывания. Если максимальная концентрация связанного лиганда равна $C_{\text{связ}}^{\text{max}}$, то можно определить долю занятых лигандом центров θ как

$$\theta = C_{\text{связ}} / C_{\text{связ}}^{\text{max}}. \quad (7.3)$$

Тогда доля незанятых центров равна $1 - \theta$, а константа связывания может быть представлена в виде

$$K_1 = \frac{\theta}{(1 - \theta) C_{\text{своб}}} \equiv \frac{C_{\text{связ}}}{[\text{Свободн. центры}] C_{\text{своб}}}. \quad (7.4)$$

Согласно этой модели, концентрация центров связывания фиксирована, а сами они независимы, эквивалентны и неподвижны. В некоторых случаях даже такая простая модель может с успехом применяться для анализа адсорбционных данных [26]. Серьезный недостаток такого подхода состоит в том, что во многих случаях центры связывания — это не какие-то дискретные участки на бислое, каждый из которых может быть представлен единственной фиксированной ячейкой решетки. Поэтому определить реальное число доступных центров связывания оказывается не так просто, как предсказывает данная модель.

Например, если одна молекула лиганда способна связываться с n молекулами фосфолипида, то центр связывания может быть определен как n молекул липида, тем или иным способом связанных с лигандом. Тогда, согласно простой модели Лэнгмюра, при

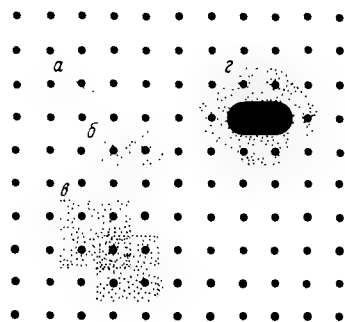


Рис. 7.1. Модели адсорбции лигандов на поверхности бислоя. Бислой рассматривается как двумерная решетка, каждый узел которой соответствует одной молекуле липида. а. Лиганд может связаться на поверхности бислоя только с одной молекулой липида. б. Лиганд может связаться с двумя молекулами липида. в. Крупный лиганд способен связаться с четырьмя липидными молекулами; показаны два перекрывающихся положения лигандов на решетке. г. Лиганд (например, амфифильное соединение или гидрофобный ион) проникает внутрь мембраны, но частично возвышается над поверхностью бислоя, эффективно связываясь с соседними липидными молекулами. В приведенной модели молекула лиганда занимает два узла решетки, но связывается еще с шестью липидными молекулами.

$n = 2$ и 10 000 молекул липида, например, число центров связывания должно было бы составить 5000. Однако это неверно, поскольку потенциальные центры связывания перекрываются (рис. 7.1). Тогда, если пренебречь краевыми эффектами, 10 000 молекул липида в квадратной решетке дадут 20 000 возможных пар перекрывающихся центров. Аккуратное вычисление числа доступных центров связывания представляет собой основную проблему при получении правильного выражения для изотермы адсорбции.

Связывание с n лигандами

Проблему правильного подсчета перекрывающихся центров связывания можно частично решить, рассмотрев простое равновесное связывание лиганда с n молекулами фосфолипидов. В этом случае образование комплекса между лигандом L и фосфолипидами P можно представить в следующем виде:



Такой способ с успехом применялся, например, для анализа связывания Ca^{2+} с фосфатидилхолиновым бислоем с $n = 2$, которое

нельзя описать с помощью простой изотермы Лэнгмюра [27]. Получаемое в рамках такой модели уравнение показывает, что график Скэтчарда должен быть не линейным, а вогнутым [1379, 1378].

Учет формы лиганда

Решить до конца эту задачу не удастся даже с помощью приведенного выше анализа, поскольку он не учитывает форму лиганда. Если рассматривать мембрану как двумерную решетку, то для полного анализа нужно рассчитать укладку на такой плоскости крупных лигандов определенной формы, каждый из которых способен связываться с несколькими определенным образом расположенными друг относительно друга узлами решетки. Например, молекула, имеющая форму стержня, будет связываться с расположенными линейно центрами решетки. Каждая связавшаяся с решеткой молекула лиганда будет в зависимости от формы блокировать определенное число дополнительных (свободных) центров связывания. Полный анализ, учитывающий как перекрывание центров связывания, так и форму лиганда, хотя и довольно сложен, был все же проделан [1378]. Такой анализ можно также распространить на лиганды, которые способны проникать внутрь мембраны и поэтому будут занимать дополнительные узлы решетки [1378].

Основной вывод состоит в том, что формальный термодинамический анализ связывания с мембраной даже небольших молекул лиганда может оказаться весьма сложным, и часто для этого недостаточно простого применения стандартных уравнений. Как мы увидим, помимо перекрывания центров связывания, ограниченного стерическими взаимодействиями, для полного описания адсорбции на поверхности мембраны заряженных лигандов необходимо учитывать также и электростатические взаимодействия.

7.1.2. КЛАССЫ ЛИГАНДОВ, СПОСОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ

Литература, описывающая взаимодействие низкомолекулярных соединений с биологическими и модельными мембранами, чрезвычайно обширна. Для простоты разделим эти соединения в соответствии с их полярностью на следующие классы: неполярные, амфифильные и ионные. С учетом такой классификации кратко рассмотрим некоторые работы, посвященные взаимодействию лигандов с мембранами.

Класс I: неполярные вещества

Липидный бислой, вообще говоря, можно рассматривать как

двумерную жидкость, поэтому определенный интерес представляет способность этой жидкости растворять небольшие неполярные молекулы. Такие данные весьма ценны для понимания того, как гидрофобные домены белков взаимодействуют с бислоем. В качестве примера можно привести исследование раствора гексана в диолеилфосфатидилхолине [755]. Вероятнее всего, в большинстве случаев такие неполярные молекулы, как гексан, локализируются в центре бислоя. Такая локализация для гексана была выявлена с помощью метода нейтронной дифракции, хотя при более высоких концентрациях гексана вполне возможны более сложные варианты взаимодействия.

Класс II: амфифильные молекулы

Это безусловно наиболее обширная из исследованных групп молекул. В нее входят многие анестетики, лекарственные препараты (в частности, транквилизаторы), фармакологическая активность которых зависит от их способности взаимодействовать с мембранами. К этой категории также можно отнести целый ряд антибиотиков и другие природные соединения, в частности соли желчных кислот и жирные кислоты. Кроме того, амфифильными свойствами обладают многие используемые для изучения мембран флуоресцентные и спиновые метки. Все эти соединения имеют четко различимые полярные и неполярные части и эффективно взаимодействуют с поверхностью мембраны. Некоторые из таких амфифильных соединений при достаточно больших концентрациях действуют на мембрану как детергенты и разрушают бислой. Показано также, что некоторые амфифильные вещества даже в умеренных концентрациях оказывают на биомембраны повреждающее действие [904].

Анестетики

Существует много типов анестетиков — от атомарного ксенона до сложных органических гетероциклических соединений. Вообще говоря, фармакологическая активность анестетиков хорошо коррелирует с их коэффициентом распределения в системе масло/вода. Это позволяет предположить, что механизм их действия включает в себя неспецифические взаимодействия с липидами мембран нервных клеток. Исследованию природы взаимодействия анестетиков с биологическими или модельными мембранами посвящено довольно много работ. Хотя в этих работах и было показано, что анестетики способны нарушать структуру липидного бислоя, механизм(ы) их действия до сих пор остается загадкой. Вполне вероятно, что эффект этих соединений прямо или косвенно связан с влиянием на специфические белки мембран нервных клеток [545, 462, 382]. Методом

ЯМР исследовали непосредственное действие на мембраны ряда анестетиков, в частности анестетика общего действия хлоральгидрата [450], анестетиков местного действия прокаина [739], тетракаина [739] и дибукаина [944] и стероидных анестетиков [911]. Распределение между мембраной и водной фазами стероидов, обладающих анестезирующим эффектом, не отличается от распределения любых других стероидов, и их влияние на состояние липидного слоя определяется, по-видимому, специфическими структурными особенностями [911].

Лекарственные препараты

Из лекарственных препаратов лучше всего исследован хлорпромазин. В частности, изучено его проникновение в липидные бислои везикулы [886] и в мембраны эритроцитов [858]. В обоих случаях коэффициенты распределения в системе мембрана/вода были одинаковы [886]. При введении в эритроциты хлорпромазина в больших количествах происходит существенное изменение структуры бислоя вплоть до его полного разрушения [858]. Максимальное количество проникшего в мембрану хлорпромазина, по оценкам, занимает объем, превышающий объем самого бислоя. Вероятно, при больших концентрациях происходит агрегация незаряженной формы этого препарата в центре бислоя, что приводит к значительному увеличению толщины мембраны. В более умеренных количествах хлорпромазин вызывает образование в мембране пор диаметром $\sim 14 \text{ \AA}$ и, как следствие, лизис. Природа формирования пор неясна.

Антибиотики

Токсичность некоторых антибиотиков обусловлена, по всей видимости, их взаимодействием с мембраной.

1. *Полимиксин В* [792] представляет собой циклический полипептид, состоящий из пяти положительно заряженных аминокислотных остатков и гидрофобной ацильной боковой цепи. Антибиотик специфичен в отношении грамотрицательных бактерий (например, *E. coli*); его мишенью являются в первую очередь отрицательно заряженные липиды в наружной клеточной и цитоплазматической мембранах. Полимиксин имеет настолько высокое сродство к отрицательно заряженным липидам, что с его помощью можно вызвать латеральное перераспределение разных форм липидов в фосфолипидных везикулах. Взаимодействие клеток *E. coli* с полимиксином приводит к увеличению проницаемости мембран и выходу цитоплазматического материала наружу, что однозначно указывает на разрушение мембраны.

2. *Полиеновые антибиотики* — амфотерицин В [225, 351, 1597], нистатин [1085] и филиппин [351] — представляют собой мембрано-активные противогрибковые препараты. Они могут вызывать лизис дрожжевых клеток, эритроцитов и клеток млекопитающих. Предполагают, что литическая активность этих антибиотиков обусловлена их ассоциацией со стероидами в мембране и формированием пор (см. разд. 8.1.5). Образование таких комплексов было обнаружено методом ЯМР [351]; определены константы комплексообразования с различными стероидами, встроенными в фосфолипидные везикулы [1597]. Богатые стероидами мембраны выявляли по флуоресценции комплексов филиппина со стероидами (см. разд. 4.4.1).

3. *Адриамицин* [530, 873, 138] по своей структуре относится к антрациклиновым гликозидам. Это противоопухолевый препарат, чье применение, правда, ограничено вследствие его кардиотоксичности. Адриамицин специфически связывается с кардиолипином в мембране, и, возможно, именно этим обусловлена его токсичность. С помощью молекулярного моделирования и минимизации энергии пытались рассчитать конформацию адриамицина, связанного с поверхностью бислоя за счет электростатического связывания с фосфатными группами кардиолипина [138].

Детергенты

Взаимодействие детергентов с мембранами уже обсуждалось в разд. 3.2. Мы упомянем здесь лишь дигитонин и близкие ему по структуре сапонины, которые имеют высокое сродство к мембраносвязанным стеролам и, по-видимому, связываются в стехиометрии 1:1 с содержащимся в мембране холестерином [1070, 991]. Полиеновые антибиотики, адриамицин и дигитонин, — это необычные примеры амфифильных молекул, обладающих избирательным сродством к определенным мембранным липидам.

Мембранные метки

Часто флуоресцентные и спиновые метки представляют собой амфифильные молекулы. В качестве примера можно привести карбоцианиновые красители, используемые для изучения кинетики восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (см. табл. 5.1 и рис. 5.6). Эта метка связывается с одной стороной мембраны и не может с помощью флип-флоп-перехода попасть на другую сторону [1598] и связаться с мембранами внутриклеточных органелл. Такая асимметрия связывания доказана экспериментально [1598]. Другой пример — спиновые [177] и флуоресцентные [1511] метки, которые могут связываться с мембраной и используются для изучения электрических свойств бислоя (см. рис. 7.9). Более подробно мембранные метки обсуждаются в разд. 7.4.1.

Класс III: гидрофобные ионы

Это молекулы, в которых заряженная группа находится в окружении неполярных групп, чем они и отличаются от простых амфифильных соединений, у которых полярная и неполярная части молекулы разделены. При связывании амфифильной молекулы с мембраной ее полярная группа оказывается локализованной ближе к водной фазе, а неполярная — погруженной в бислой. В случае же гидрофобных ионов заряженная часть по крайней мере на несколько ангстрем проникает в гидрофобную область мембраны [439]. Примерами могут служить ионы тетрафенилбората и тетрафенилфосфония (см. рис. 7.9). Гидрофобными ионами являются и некоторые ионофоры (разд. 7.5.2). Более детально свойства этих соединений (в частности, причина относительной легкости, с которой они могут пересекать бислой) будут рассмотрены в этой главе ниже.

Класс IV: ионы

Особый интерес представляют одно- и двухвалентные катионы, поскольку они уравнивают суммарный отрицательный заряд большинства мембран. Кроме того, многие катализируемые мембраносвязанными ферментами мембранные процессы зависят от pH, поэтому большую роль играет распределение протонов вблизи бислоя. Эти вопросы будут обсуждаться в разд. 7.3.3.

7.2. Проницаемость липидных бислоевых мембран для неэлектролитов [1546, 856]

Способность молекулы растворенного низкомолекулярного вещества проникать через мембрану количественно выражается коэффициентом проницаемости. Физиологическое значение изучения мембранной проницаемости не вызывает сомнения. В отсутствие специфических транспортных белковых систем молекулы растворенного вещества могут попасть в клетку, только проникнув в липидный бислой. Кроме того, по мембранной проницаемости можно судить о структуре и динамических свойствах липидного бислоя. Скорость вращательной и латеральной диффузии молекул в мембранах определяют с помощью сложных методов, однако коэффициент трансмембранной диффузии для пересекающих бислой молекул можно определить на основе простого измерения проницаемости [856]. Механизм проникновения молекул через бислой также представляет большой интерес и может зависеть от наличия лабильных структурных дефектов в углеводородной области мембраны.

Чтобы пересечь бислоем, молекула должна 1) проникнуть в мембрану, преодолев поверхностное натяжение или барьер свободной энергии на границе мембраны; 2) продиффундировать через бислой; 3) выйти из мембраны с противоположной стороны, вновь преодолев энергетический барьер на границе раздела фаз. Каждый из этих этапов в принципе может быть лимитирующей стадией всего процесса. Способность большинства неэлектролитов проходить через бислоиные липидные мембраны можно с успехом описать с помощью модели, учитывающей растворение данного вещества в мембране и его диффузию поперек бислоя. Согласно этой модели, лимитирующей стадией является диффузия молекулы в липидном бислое, а энергетические барьеры на границе раздела фаз считаются пренебрежимо малыми. Это позволяет полагать, что равновесие между водной и мембранной фазами (этапы 1 и 3 на рис. 7.2) устанавливается быстро. Коэффициент распределения K_p задается в

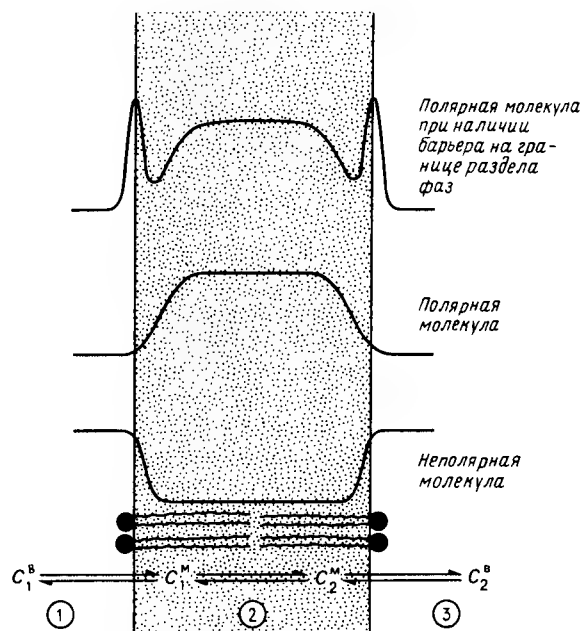


Рис. 7.2. Схематическое представление энергетического барьера, который должны преодолеть полярные и неполярные молекулы при проникновении через липидную бислоюную мембрану. C^M и C^B — концентрации растворенного вещества в мембране и в водной фазе. Цифры в нижней части схемы указывают последовательные стадии диффузии растворенного вещества через мембрану — из водной фазы слева от мембраны в водную фазу справа от мембраны.

этом случае выражением

$$K_p = \frac{C_1^M}{C_1^B} = \frac{C_2^M}{C_2^B}. \quad (7.6)$$

Определим коэффициент проницаемости P как коэффициент пропорциональности в выражении для суммарного потока растворенного вещества со стороны 1 на сторону 2 через мембрану толщиной d , когда концентрации вещества в водных фазах по разные стороны мембраны различны:

$$\text{Поток} = \frac{\text{Число молей растворенного вещества}}{c \cdot \text{см}^2} = P(C_1^B - C_2^B). \quad (7.7)$$

Этот же поток можно выразить через коэффициент диффузии, используя первый закон Фика. Коэффициент диффузии определяется как коэффициент пропорциональности, связывающий поток и градиент концентрации растворенного вещества внутри мембраны:

$$\text{Поток} = -D_M \frac{dC}{dx} \approx -D_M \frac{(C_1^M - C_2^M)}{d}. \quad (7.8)$$

Предполагается, что в мембране устанавливается линейный градиент концентрации. Подставляя выражение (7.6) в (7.8), получим

$$\text{Поток} = D_M \frac{(C_1^B - C_2^B)}{d} K_p. \quad (7.9)$$

Сравнение выражений (7.7) и (7.9) показывает, что

$$P = \frac{K_p D_M}{d}. \quad (7.10)$$

Таким образом, коэффициент проницаемости равен произведению коэффициента распределения и коэффициента диффузии вещества в мембране, деленному на толщину мембраны. Он измеряется в см/с, т. е. имеет размерность скорости.

С другой стороны, поток через мембрану можно выразить через константу скорости первого порядка k , имеющую размерность с^{-1} :

$$\text{Поток} = k \Delta N, \quad (7.11)$$

где ΔN — разность поверхностных концентраций растворенного вещества между двумя сторонами мембраны в моль/см². Константа скорости также связана с коэффициентом проницаемости следующим соотношением, получаемым аналогично уравнению (7.10):

$$P = k\beta, \quad (7.12)$$

где β — коэффициент распределения для поверхностных концентраций [уравнение (7.2)]. Такой подход удобен тем, что величина, об-

ратная k , является мерой характерного времени перехода молекулы через бислой и k можно использовать для определения высоты энергетического барьера для пассивного транспорта.

Заметим, что уравнение (7.7) для проницаемости по своей форме аналогично выражению для закона Ома для электрического тока. Такая аналогия помогает понять физический смысл проницаемости. Разность концентраций ΔC представляет собой движущую силу, аналогичную электрическому напряжению, а поток растворенного вещества через мембрану эквивалентен электрическому току. Тогда величина, обратная проницаемости ($1/P$), эквивалентна электрическому сопротивлению, а сам коэффициент проницаемости — проводимости:

$$\text{Поток} = \frac{\text{Движущая сила}}{\text{Сопротивление}} = \text{Движущая сила} \cdot \text{Проводимость}.$$

Продолжая аналогию, поток растворенного вещества через мембрану в соответствии с рис. 7.2 можно представить в виде эквивалентной электрической схемы, содержащей три последовательно соединенных сопротивления: сопротивление на входе в мембрану и выходе из нее и сопротивление самой мембраны. Уравнение (7.10) выведено исходя из предположения, что сопротивление на границе липид — вода пренебрежимо мало, что, вообще говоря, не всегда верно [331].

Экспериментально измеренный коэффициент распределения неэлектролита между водной фазой и мембраной близок к коэффициенту распределения в системе вода/неполярный растворитель [331, 1386]. Из рис. 7.3 видно, что проницаемость фосфолипидного бислоя для неэлектролитов хорошо коррелирует с коэффициентом распределения в системе вода/гексадекан, причем эта корреляция сохраняется при изменении проницаемости в миллион раз. Эти данные подтверждают так называемое правило Овертона, согласно которому коэффициент проницаемости коррелирует с коэффициентом распределения в системе масло/вода. Наблюдения, послужившие основой правила Овертона, были сделаны еще в прошлом веке и послужили первыми указаниями на существование ограничивающего клетку мембранного барьера (см. гл. 1). Приведенная на рис. 7.3 линейная корреляция не означает, что коэффициент диффузии в уравнении (7.10) одинаков для всех веществ. Однако эти данные указывают на систематическое изменение D_m с изменением коэффициента распределения для данного рода соединений, т. е. D_m нельзя рассматривать как независимую переменную. Это положение выполняется не всегда: например, Стейн и др. [856, 1386] показали, что для некоторых биомембран отклонения от правила Овертона могут объясняться различиями в величине D_m для разных веществ.

Прямая на рис. 7.3 проведена по методу наименьших квадратов

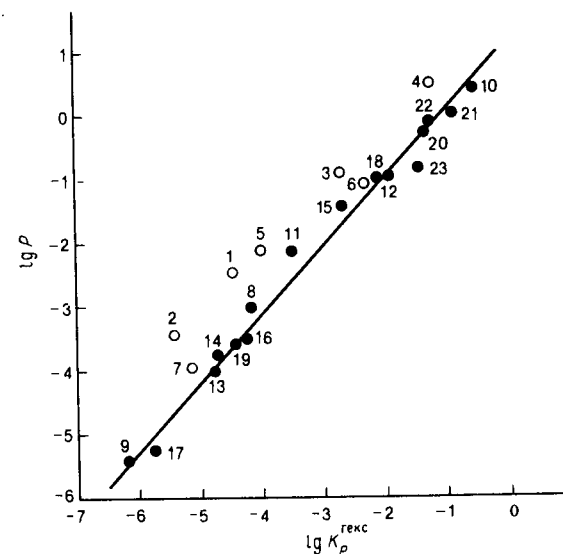


Рис. 7.3. Зависимость коэффициентов проницаемости (P) веществ через плоскую мембрану из яичного фосфатилхолина от коэффициентов распределения ($K^{\text{гекс}}$) этих веществ в системе гексадекан/вода [1546]. Семь соединений, молекулы которых имеют самые маленькие размеры (светлые кружки), при линейном регрессионном анализе не учитывались. Приведены данные для следующих веществ: 1 — вода, 2 — фтористоводородная кислота, 3 — аммиак, 4 — соляная кислота, 5 — муравьиная кислота, 6 — метиламин, 7 — формамид, 8 — азотная кислота, 9 — мочевина, 10 — тиоциановая кислота, 11 — уксусная кислота, 12 — этиламин, 13 — этандиол, 14 — ацетамид, 15 — пропионовая кислота, 16 — 1,2-пропандиол, 17 — глицерол, 18 — масляная кислота, 19 — 1,4-бутандиол, 20 — бензойная кислота, 21 — капроновая кислота, 22 — салициловая кислота, 23 — кофеин.

через точки, соответствующие веществам с мол. массой от 50 до 300. Светлыми кружками представлены данные для веществ с очень маленькими молекулярными массами, например для воды. Для них величина P в 2—15 раз больше, чем ожидаемая исходя из данных для крупных молекул [1546]. Это и другие отклонения от правила Овертона, полученные при изучении проницаемости мембран эритроцитов [856], использовались для подтверждения адекватности модели процесса диффузии через бислой. Согласно модели, эти отклонения отражают крутую зависимость коэффициента мембранной диффузии D_m от размеров молекулы растворенного в бислое вещества. Такая зависимость наблюдалась ранее для диффузии в некоторых полимерах [1546, 856, 1386]. Диффузия молекул в полимере и

в жидкости по-разному зависит от размеров и формы молекулы растворенного вещества. Согласно уравнению Стокса — Эйнштейна, коэффициент поступательной диффузии для сферической частицы обратно пропорционален ее радиусу. Поступательную диффузию в полимере можно рассматривать как цепь последовательных переходов молекулы между соседними элементами свободного объема, которые спонтанно формируются при флуктуациях полимера. Скорость диффузии в таком случае будет зависеть от числа элементов необходимого объема и от скорости их образования. В результате зависимость коэффициента диффузии вещества в полимере от размеров и формы диффундирующей молекулы будет очень сильно отличаться от аналогичной зависимости для диффузии в жидкости. И биомембраны [856], и чистые фосфолипидные бислои [1546], по-видимому, в отношении коэффициентов поступательной диффузии низкомолекулярных неэлектролитов ведут себя как размягченные полимеры.

В табл. 7.1 приведены коэффициенты проницаемости биологических и модельных мембран для нескольких типов небольших молекул. Детальное обсуждение способов измерения этих коэффициентов выходит за рамки данной книги, однако в работе Стейна [1386] можно найти некоторые методические подробности. Обычно такого рода исследования включают измерение количества радиоактивно меченных соединений, накопившихся или вышедших из клеток или многослойных липосом либо перенесенных через плоскую мембрану. Плоские мембраны более всего подходят для электрометрического измерения ионных потоков, но нередко используются и для изучения транспорта неэлектролитов. Липосомы позволяют получить очень большую площадь поверхности и весьма стабильны, что дает возможность изучать транспорт молекул при чрезвычайно низких коэффициентах проницаемости. По оценкам, площадь поверхности мембран в суспензии липосом с концентрацией 2 мг/мл составляет $10\,000\text{ Å}^2/\text{мл}$ [311]. При этом за проницаемостью липосом следят, измеряя мутность или светорассеяние суспензии. Как видно из табл. 7.1, вода проникает через бислоиные мембраны относительно легко и при изменении осмотичности среды в результате переноса растворенных веществ будет перемещаться внутрь липосом или из них (разд. 7.2.1). При сжатии или набухании многослойных липосом будет изменяться мутность суспензии, и следя за этим изменением, можно определить проницаемость мембран для того или иного вещества. Единственная техническая проблема в таких исследованиях — наличие у поверхности мембраны непроницаемого слоя толщиной 50 нм или более. Локальная концентрация растворенного вещества в этом слое из-за плохого перемешивания может очень сильно отличаться от концентрации данного вещества в объеме [1546].

Таблица 7.1. Коэффициенты распределения некоторых веществ и проницаемость для них мембран

Вещество	Мембрана ¹⁾	Коэффициент проницаемости, см/с	Константа скорости, 1/с	Коэффициент распределения в системе гексакан/вода ²⁾	Ссылка
1. Вода	Яичный фосфатидилхолин (плоская)	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^{-5}$	[1546]
	Яичный фосфатидилхолин (липосомы)	$2,0 \cdot 10^{-4}$			[311]
	Эритроциты	$1,2 \cdot 10^{-3}$			[856]
2. Мочевина	Яичный фосфатидилхолин (плоская)	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$3,6 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^{-7}$	[1546]
	Эритроциты	$7,7 \cdot 10^{-7}$			[856]
3. Глицерол	Яичный фосфатидилхолин (плоская)	$5,4 \cdot 10^{-6}$	$2,5 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^{-6}$	[1546]
	Эритроциты	$1,6 \cdot 10^{-7}$			[856]
4. Тетрафенилфосфоний (ТФФ ⁺)	Яичный фосфатидилхолин (плоская)	10^{-7}	$\sim 10^{-2}$	$\sim 10^2$	[439]
5. Тетрафенилборат (ТФБ ⁻)	Яичный фосфатидилхолин (липосомы)	10^{-1}	$\sim 10^1$	$\sim 10^5$	[439]
6. Na ⁺	Яичный фосфатидилхолин (липосомы)	$\sim 10^{-14}$	—	—	[601]
7. Cl ⁻	Яичный фосфатидилхолин (липосомы)	$\sim 10^{-11}$	—	—	[601]
8. H ⁺ /OH ⁻	Яичный фосфатидилхолин	10^{-4} — 10^{-8}	—	—	[1139, 563]

¹⁾ Измерения проводились как на плоской мембране, разделяющей два водных компартмента, так и на липосомах [311, 1386].

²⁾ Коэффициенты распределения для ТФФ⁺ и ТФБ⁻ даны для системы липидный бислой/вода, а не для системы гексакан/вода.

Таким образом, барьером проницаемости биомембран для низкомолекулярных неэлектролитов является фосфолипидный бислой. В отсутствие специфических каналов модельные бислоиные мембраны и биомембраны ведут себя сходным образом.

7.2.1. ПРОНИЦАЕМОСТЬ ДЛЯ ВОДЫ [311, 81]

Как это ни удивительно, вода может довольно легко проникать через фосфолипидный слой. Приведенные в разд. 2.2.1 данные однозначно показывают, что внутри мембраны в гидрофобной ее области воды практически нет. Коэффициент распределения для воды в гексадекане не противоречит этому выводу, поскольку предсказывает, что концентрация воды в мембране должна быть порядка нескольких миллимолей, т. е. на 10^3 молекул фосфолипида должна приходиться примерно одна молекула воды. Кроме того, из значения коэффициента проницаемости следует, что при движущей силе, соответствующей трансмембранной разности концентраций 0,1 М, скорость потока воды должна составить около 10—100 молекул в секунду на молекулу фосфолипида. Как следует из рис. 7.3, по сравнению с другими неэлектролитами проницаемость фосфолипидного бислоя для воды выше, но не намного. Константа скорости для потока воды составляет 10^6 с^{-1} , т. е. молекула воды диффундирует через всю толщину мембраны всего за 1 мкс. Таким образом, очень маленькая стационарная концентрация воды в гидрофобной области мембраны вполне согласуется с наличием весьма интенсивного ее потока через бислой.

Не исключено также, что концентрация воды в гидрофобной области бислоя выше, чем оцениваемая исходя из данных о коэффициенте распределения. Более того, в ряде работ высказывается предположение о существовании в мембране временных трансбислойных цепочек из молекул воды, соединенных водородными связями [1049, 310]. Предполагается, что такие структуры играют роль проводников протонов через мембрану (разд. 7.5.1).

Транспорт воды через липидный бислой можно также изучать, используя и однослойные везикулы [1408]. Такие везикулы представляют собой прекрасные осмометры. Если концентрация соли внутри них выше, чем снаружи, то поток воды будет направлен внутрь везикулы, что приведет к созданию осмотического давления и последующему набуханию липосом. При набухании везикулы могут увеличиваться в радиусе вплоть до 5% и при этом оставаться стабильными, но степень набухания в очень большой степени зависит от размеров везикулы.

Проницаемость биомембран для воды обычно раз в 10 выше, чем проницаемость модельных мембран. Наиболее детально изуче-

ны в этом отношении эритроциты [81, 1463]. Как показано в целом ряде лабораторий, обработка мембран эритроцитов сульфгидрильным реагентом *п*-хлормеркурийбензосульфонатом приводит к ингибированию транспорта воды, уменьшая проницаемость для нее до уровня, характерного для липидного бислоя. По-видимому, этот SH-реагент действует на белок полосы 3, а возможно, и на белок полосы 4.5 анионного канала эритроцитов (см. разд. 8.3.3). По-видимому, проницаемость эритроцитарных мембран для воды обусловлена главным образом транспортом через канал, образуемый белком анионного переносчика. Аналогичные результаты были получены для препаратов мембран почек, откуда следует, что каналы для воды имеются и в этой системе [1487].

7.3. Электрические свойства мембран

Прежде чем перейти к обсуждению проницаемости липидного бислоя для ионов (разд. 7.5), рассмотрим электрические свойства мембран. Нам нужно найти суммарный трансмембранный электрический потенциал, что позволит оценить работу, необходимую для перемещения заряда из одной точки в другую. Это нужно для понимания механизма перемещения ионов через мембрану и для анализа распределения зарядов внутри мембраны и у ее поверхности. Это могут быть ионы, находящиеся в водной фазе у поверхности бислоя или на границе раздела фаз мембрана—вода, а также белки с заряженными аминокислотными остатками. В разд. 6.2 мы уже приводили примеры ферментов, функционирование которых зависит от поверхностной плотности зарядов на мембране. Мы также обсудили формирование трансмембранных каналов белком аламе-тицином в ответ на электрическое напряжение (разд. 3.7.1). В последующих разделах мы рассмотрим работу каналов с потенциалзависимой воротной системой.

Напомним некоторые определения [633].

1. Число Фарадея F — это заряд одного моля одновалентного иона:

$$F = \text{Число Авогадро} \cdot \text{Элементарный заряд} = \\ = (6,022 \cdot 10^{23}) \cdot 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ кулон} = 10^5 \text{ кулон/моль.}$$

2. Электрическое напряжение V . Применительно к мембранам термины «напряжение», «потенциал», «разность потенциалов» и «разность напряжений» эквивалентны. Напряжение — это электрическая работа, необходимая для перемещения (без трения) заряда из одной точки пространства в другую. Напряжение 1 В соответствует разности потенциалов, для перемещения против которой заряда, равного 1 Кл, нужно совершить работу в 1 Дж. При измере-

нии напряжения всегда нужна некая точка отсчета. Для мембран обычно в качестве такой точки берется точка, расположенная очень (бесконечно) далеко от поверхности мембраны, и потенциал в ней принимается равным нулю.

3. *Сила тока* I измеряется в амперах; один ампер по определению равен одному 1 Кл/с.

4. *Проводимость* (G) или *сопротивление* (R) характеризует сопротивление потоку заряженных частиц, направленному от одной точки к другой. Эти величины определяются из закона Ома, связывающего силу тока (поток) с разностью потенциалов (движущей силой):

$$I = GV, \text{ или } I = (1/R) V. \quad (7.13)$$

Проводимость измеряется в сименсах (См), а обратная ей величина — сопротивление — в омах (Ом). Проводимость 1 См означает, что при изменении разности потенциалов на 1 В сила тока изменяется на 1 Кл·с⁻¹.

5. *Удельное сопротивление* ρ используется для характеристики гомогенных проводящих сред (например, растворов солей), в частности для описания ионного потока через заполненные водой мембранные каналы. Удельное сопротивление — это электрическое сопротивление среды между двумя электродами площадью 1 см², находящимися друг от друга на расстоянии 1 см. Размерность удельного сопротивления — Ом·см. Сопротивление среды между двумя электродами площадью A , находящимися на расстоянии x друг от друга, можно определить по формуле

$$R = \frac{\rho x}{A}. \quad (7.14)$$

6. *Емкость* C . Для создания разности потенциалов между двумя точками, в частности между двумя сторонами бислоя, достаточно просто разделить заряды между этими точками. Емкость — это величина разделенных зарядов, необходимая для создания определенной разности потенциалов:

$$C = Q/V, \quad (7.15)$$

где Q — величина заряда с каждой стороны мембраны, положительного с одной и отрицательного с другой, V — создаваемая разность потенциалов. Емкость измеряется в фарадах. Емкость мембраны — очень важная электрическая характеристика, поскольку она определяет, какое количество зарядов нужно перенести через мембрану, чтобы создать на ней определенное напряжение. Удельная емкость равна емкости единицы площади и зависит от количества зарядов, разделенных на единицу площади мембраны.

В первом приближении бислойную мембрану можно предста-

вить в виде тонкой пластины из непроводящего материала, разделяющей два водных раствора. Таким образом, мембрана является обычным плоским конденсатором, в котором заряды находятся на двух границах раздела фаз мембрана—вода. Емкость такого конденсатора зависит только от расстояния между двумя заряженными поверхностями (d) и диэлектрической проницаемости (ϵ) материала (углеводорода) между этими поверхностями. Диэлектрическая проницаемость характеризует поляризуемость материала, т. е. то, насколько эффективно помещенный в среду из этого материала постоянный электрический диполь «чувствует» приложенное электрическое поле (разность потенциалов). Большая диэлектрическая проницаемость формально означает «компенсацию» части зарядов на поверхности мембраны, так что для создания одной и той же разности потенциалов в случае большой ϵ необходимо перенести через мембрану больший заряд.

$$C = \frac{\epsilon \epsilon_0 A}{d}, \quad (7.16)$$

где ϵ_0 — так называемая абсолютная диэлектрическая проницаемость, т. е. диэлектрическая проницаемость вакуума, равная $8,85 \cdot 10^{-12}$ Кл·В⁻¹·м⁻¹. Для фосфолипидных бислоев и биомембран измеряемые значения удельной емкости примерно равны и составляют около 1 мкФ/см², что соответствует диэлектрической проницаемости $\epsilon = 2$ при толщине около 25 Å. В отличие от емкости электрическое сопротивление мембраны зависит от ее типа и от числа ионных каналов и для разных мембран варьирует в широких пределах (гл. 8).

Теперь мы можем перейти к определению суммарного трансмембранного электрического потенциала. Работа, необходимая для перемещения заряда, который находится на бесконечно большом расстоянии от мембраны, к поверхности мембраны, а затем в гидрофобную область бислоя, имеет следующие составляющие.

1. *Работа, связанная с переносом заряда из среды с одной диэлектрической проницаемостью в среду с другим ее значением* (например, из водной фазы в мембрану). Необходимость совершения такой работы связана с различием в поляризации диполей этих сред, и именно этим в значительной степени обусловлена дестабилизация зарядов в гидрофобной области мембраны.

2. *Дипольный потенциал*. Основной вклад вносят, по-видимому, ориентированные карбонильные группы фосфолипидных молекул. Возможно, определенную роль играют и ориентированные молекулы воды.

3. *Поверхностный потенциал*. Создается заряженными группами на поверхности мембраны.

4. *Трансмембранный потенциал*. Образуется за счет разделения

зарядов между водными фазами по разные стороны мембраны. Он может создаваться в результате работы электрогенных ионных насосов или благодаря пассивной проницаемости бислоя для ионов в равновесных или стационарных условиях.

Рассмотрим вкратце каждый из этих компонентов.

7.3.1. РАБОТА, СОВЕРШАЕМАЯ ПРИ ПЕРЕНОСЕ ИОНА ВНУТРЬ БИСЛОЙНОЙ МЕМБРАНЫ [646]

Любой ион в воде стабилизируется благодаря взаимодействиям с диполями воды (энергия гидратации). Перемещение иона из воды в центр мембраны энергетически невыгодно, поскольку сопряжено с затратами энергии на освобождение иона от гидратной оболочки. Наиболее адекватной количественной моделью такого перехода является модель Борна. Работа, необходимая для переноса иона с зарядом q и радиусом r из среды с диэлектрической проницаемостью ϵ_2 в среду с диэлектрической проницаемостью ϵ_1 , определяется по формуле

$$W = \frac{q^2}{2R} \left(\frac{1}{\epsilon_1} - \frac{1}{\epsilon_2} \right). \quad (7.17)$$

Диэлектрическая проницаемость воды (ϵ_2) равна 80; для внутренней части мембраны обычно используют характерную для углеводородов величину $\epsilon_1 = 2$. Тогда работа, совершаемая при переносе иона с валентностью Z , составит $W = (81 Z^2/r)$ ккал/моль. То есть для перемещения внутрь мембраны одновалентного иона радиусом $2 \text{ \AA}$ нужно затратить 40 ккал/моль. Ясно, что такое перемещение энергетически весьма невыгодно, иными словами, бислой является труднопреодолимым барьером для ионов. Отметим, однако, что ионы большого радиуса весьма эффективно могут стабилизироваться в мембране. Это помогает понять, каким образом проникают через мембрану такие ионы, как I_3^- , SCN^- и заряженные комплексы ионов с ионофорами.

Помимо энергии Борна имеется еще один компонент, связанный с возникновением на границе с диэлектриком сил поляризации. Появление заряда по одну сторону от границы раздела фаз вызывает переориентацию диполей в среде по другую сторону мембраны. Соответствующая энергия называется энергией «отображения» (от названия математического метода, используемого для ее вычисления). Для мембран она соответствует только 10–15%-ному уменьшению энергии Борна.

Все упомянутые модели рассматривают мембрану как простой слой диэлектрика. Ясно, однако, что находящиеся по краям бислоя полярные головки создают слой толщиной около $10 \text{ \AA}$, существенно отличающийся по своим свойствам от гидрофобного центра.

Диэлектрическая проницаемость в этой области должна измениться от 2 по одну сторону до 80 — по другую; в качестве средней величины приводятся значения от 10 до 30. Согласно модели, в это значение вносит свой вклад вращение полярных фосфолипидных головок [1201]. Гидрофильные области мембран интересны еще и тем, что именно здесь происходит связывание многих мембранных зондов и амфифильных молекул.

7.3.2. ПОТЕНЦИАЛ ВНУТРЕННИХ ДИПОЛЕЙ [646, 439, 438]

Как показывают экспериментальные и теоретические данные, ориентированные диполи на поверхности мембраны создают в центре фосфолипидного бислоя потенциал, равный примерно 240 мВ, положительный внутри. Это эквивалентно вкладу в свободную энергию 5,5 ккал/моль, положительному для катионов и отрицательному для анионов. Полярные фосфохолиновые головки ориентированы параллельно плоскости мембраны (разд. 2.2.4) и не должны ни при каких условиях образовывать диполи, направленные положительно заряженным концом внутрь мембраны, поскольку для этого положительно заряженный остаток холина должен располагаться ближе к центру бислоя, чем отрицательно заряженный фосфат. Вероятнее всего, внутренние диполи связаны с ориентированными карбоильными группами эфирных связей фосфолипидных молекул. Влияние этого потенциала на профиль потенциальной энергии, по-видимому, ограничивается лишь внутренней частью мембраны и проиллюстрировано на рис. 7.4.

При транспорте ионов небольшого размера, например Na^+ и Cl^- , это приводит к тому, что высота энергетического барьера для транспорта анионов через бислой оказывается несколько меньшей, чем для транспорта катионов. Тем не менее для небольших ионов любого заряда этот барьер остается достаточно высоким, а результирующие коэффициенты проницаемости через бислой — очень малыми (табл. 7.1).

Все сказанное не распространяется на такие гидрофобные ионы, как TFF^+ и TFB^- (рис. 7.9). У этих ионов заряд окружен неполярными группами, и благодаря вкладу гидрофобной компоненты в суммарное изменение свободной энергии коэффициент распределения для этих ионов сильно сдвинут в пользу мембраны. Гидрофобность окружения позволяет скомпенсировать большую часть электростатической энергии (энергии Борна). Кроме того, сама энергия Борна для этих ионов меньше из-за их относительно больших размеров ($4 \text{ \AA}$). Профиль свободной энергии для гидрофобных ионов также показан на рис. 7.4. Как видно из этих данных, гидрофобная компонента свободной энергии для обоих ионов составляет около -7 ккал/моль, а взаимодействие с внутренними диполями приво-

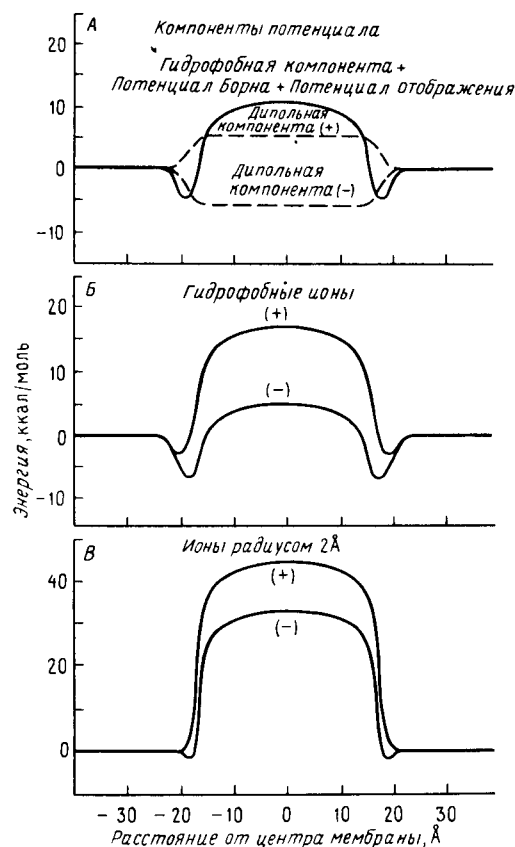


Рис. 7.4. Теоретический трансмембранный профиль свободной энергии с учетом вклада энергии Борна, энергии электростатического отображения, а также дипольной и гидрофобной (нейтральной) компонент [646]. *А. Гидрофобные ионы.* Вклады энергии Борна, энергии электростатического отображения и гидрофобных взаимодействий (сплошная кривая) для ионов, различающихся только зарядом, одинаковы. В то же время вклады дипольной компоненты (пунктир) для гидрофобных катионов и анионов существенно различаются, что приводит к большей стабилизации анионов в бислое. *Б. Гидрофобные ионы;* общий профиль свободной энергии для гидрофобных анионов и катионов радиусом 4 Å. Обратите внимание на места связывания ионов вблизи поверхности бислоя и относительно низкий барьер для переноса гидрофобных анионов через мембрану. *В. Ионы радиусом 2 Å.* Энергетический барьер для трансмембранного переноса обычных неорганических ионов весьма высок. Для переноса анионов он несколько ниже благодаря вкладу дипольного потенциала.

дит к стабилизации гидрофобных анионов в бислое. Обратите внимание на минимумы в профиле потенциальной энергии, соответствующие связыванию гидрофобных анионов вблизи поверхности мембраны — в той области, где локализуются эфирные группы фосфолипидов [438].

В результате влияния потенциала внутренних диполей гидрофобные анионы значительно прочнее связываются с бислоем и легче проникают через мембрану, чем гидрофобные катионы, имеющие очень близкую структуру: коэффициенты проницаемости для них различаются на шесть порядков (см. табл. 7.1), а константы связывания с бислоем — на четыре-пять порядков.

При связывании некоторых гидрофобных ионов (как анионов, так и катионов) с фосфатидилхолиновым бислоем наблюдается насыщение при концентрации ионов ~1 молекула на 100 молекул липида [439]. Это обуславливается электростатическим отталкиванием за счет поверхностного потенциала, образующегося при связывании ионов с поверхностью бислоя. Эти эффекты обсуждаются в следующем разделе.

7.3.3. ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕМБРАНЫ [952, 68]

Поверхность большинства биомембран отрицательно заряжена в основном благодаря присутствию кислых фосфолипидов: обычно 10—20% мембранных липидов находятся в форме анионов. Отрицательным зарядом обладают и другие мембранные компоненты, например ганглиозиды или белки. Так, суммарный отрицательный заряд мембран тилакоидов в основном обусловлен белками [68]. Отрицательно заряженные группы, например фосфатные или карбоксильные, фиксированы на поверхности мембраны, и, естественно, их заряд нейтрализуется противоионами. Однако противоионы подвижны, а не закреплены жестко на поверхности мембраны; их концентрация меняется в объеме водной фазы таким образом, что устанавливается определенный баланс между стремлением ионов к равномерному распределению по объему вследствие энтропийного фактора и электростатическим притяжением к поверхностным зарядам. В результате противоионы локализуются не на самой поверхности мембраны, а на некотором расстоянии от нее, создавая так называемый двойной диффузионный слой. С физической точки зрения он представляет собой поверхность мембраны с фиксированной плотностью зарядов и диффузное облако противоионов вблизи нее. Электрический потенциал в околосмембранном слое раствора является функцией поверхностной плотности заряда, а также концентрации и валентности ионов в растворе. Наличие поверхностного потенциала приводит к ряду важных последствий, которые можно проверить экспериментально и объяснить с помощью довольно не-

сложных теоретических построений. В этом разделе мы не будем останавливаться на выводе соответствующих соотношений [952, 68], а сконцентрируем свое внимание на тех последствиях, к которым приводит существование фиксированных зарядов на поверхности мембраны.

В теоретическом плане задача состоит в определении величины электрической потенциальной энергии как функции расстояния от поверхности мембраны. После нахождения этой зависимости можно вычислить локальную концентрацию любого иона и количественно описать любое связанное с поверхностным потенциалом явление, например электрофоретическую подвижность везикул или электростатическое притяжение между двумя соседними мембранами. Соответствующая теория разработана в начале века Гюи и Чапменом, а позднее, в 20-х гг., дополнена Штерном. Эта теория, получившая название теории Гюи—Чапмена или Гюи—Чапмена—Штерна, весьма успешно описывает связанные с заряженной мембраной электростатические эффекты.

В основу теории Гюи—Чапмена положены четыре предположения: 1) заряды равномерно распределены по поверхности мембраны; 2) ионы в растворе являются простыми точечными зарядами пренебрежимо малых размеров; 3) так называемые эффекты отображения — притяжение подвижных ионов при приближении к поверхности диэлектрика — считаются пренебрежимо малыми; 4) диэлектрическая проницаемость водной фазы считается величиной постоянной, одинаковой на поверхности мембраны и в объеме раствора. Каждое из этих предположений было проверено экспериментально и показано, что все они вполне разумны [951, 1596, 597]. Дополнение Штерна учитывает размеры связанных с поверхностью противоионов, что дает верхний предел числа ионов, которые физически могут связаться с мембраной.

Теоретические предсказания удобнее всего проиллюстрировать графически. На рис. 7.5 приведен профиль электрического потенциала в среде, содержащей соль одновалентных металлов (например, NaCl) в концентрации 0,1 М при разной поверхностной плотности заряда. Один заряд на $300 \text{ \AA}^2$ соответствует примерно 20 мол. % отрицательно заряженного фосфолипидов, а один заряд на $60 \text{ \AA}^2$ — бислою из чисто отрицательно заряженного липида. Как можно видеть из рисунка, электростатические эффекты распространяются на довольно значительные расстояния от поверхности мембраны. Потенциал на поверхности мембраны ($x = 0$) называется поверхностным, Ψ_0 , и, очевидно, является функцией поверхностной плотности заряда. Рис. 7.5 иллюстрирует также влияние увеличения концентрации соли одновалентного металла в растворе. При высоких концентрациях соли электростатические эффекты в значительной мере нивелируются. При этом наблюдается уменьшение как поверхност-

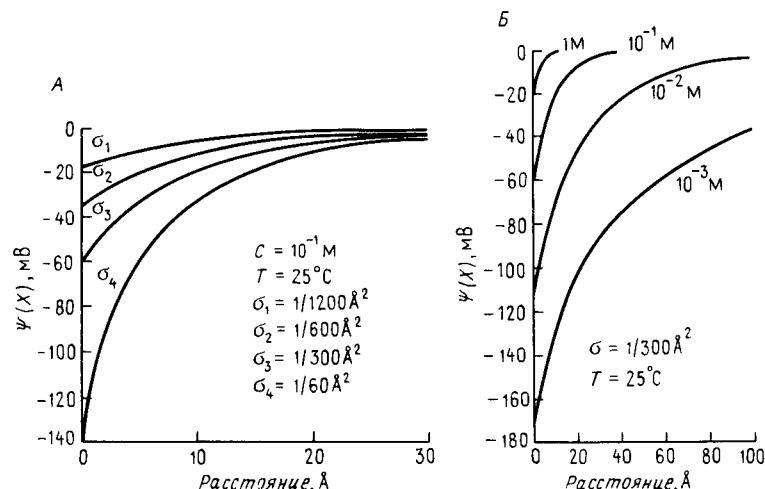


Рис. 7.5. Зависимость электрического потенциала от расстояния x до поверхности заряженной мембраны, предсказываемая теорией Гюи—Чапмена [952]. А. Профили потенциала при разных значениях поверхностной плотности заряда σ . Один заряд на $60 \text{ \AA}^2$ соответствует бислою, в котором каждая молекула липида несет один отрицательный заряд. Б. Профили потенциала при разных концентрациях одновалентного электролита (например, NaCl) в объеме раствора. Отметим, что от ионной силы зависит как величина поверхностного потенциала, так и расстояние от бислоя, на которое простирается этот потенциал. При вычислениях предполагалось, что 20% липида находятся в анионной форме.

ного потенциала, так и эффективного расстояния, на которое простирается двойной электрический слой. Как следует из теории, для двухвалентных ионов экранирующий эффект выражен еще сильнее (рис. 7.6): влияние на поверхностный потенциал мембраны двухвалентных катионов, например Ca^{2+} , проявляется при значительно меньших концентрациях, чем одновалентных. Эффекты, которые иллюстрирует рис. 7.6, не связаны с сорбцией ионов на поверхности мембраны, а обусловлены только экранированием. Наблюдаемое же довольно часто связывание двухвалентных катионов с заряженными группами на поверхности мембраны приводит к еще более выраженному уменьшению поверхностного потенциала (разд. 7.3.1).

Рис. 7.7 иллюстрирует влияние электрического потенциала на распределение анионов и катионов в растворе. Локальную концентрацию любого иона при известном электрическом потенциале несложно найти с помощью уравнения Больцмана:

$$C(x) = C(\infty)e^{-ZF\Psi(x)/RT}, \quad (7.18)$$

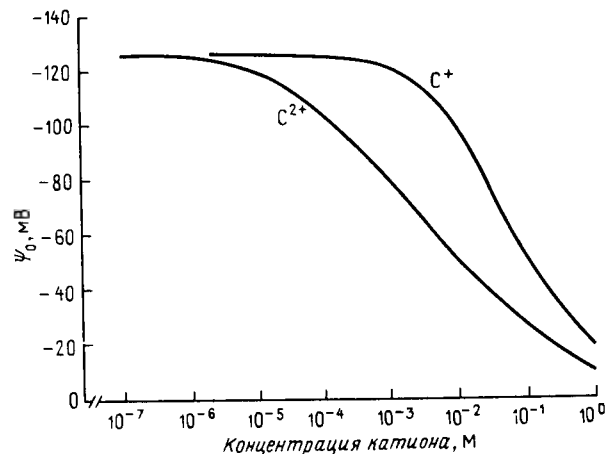


Рис. 7.6. Влияние двух- и одновалентных катионов на поверхностный потенциал мембраны, несущей примерно один отрицательный заряд на 10 липидных молекул ($-0,025 \text{ Кл/м}^2$) [68]. Эффекты обусловлены только электростатическим экранированием и не имеют отношения к связыванию катионов с заряженными группами на мембране.

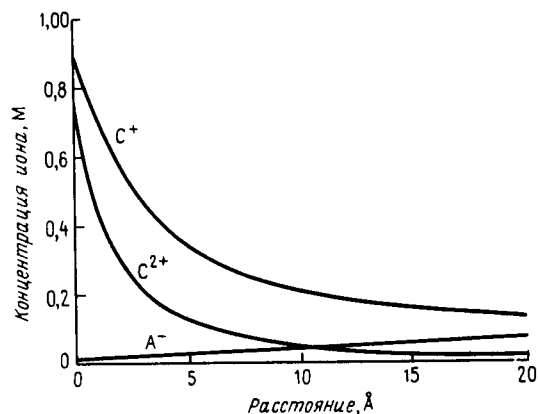


Рис. 7.7. Распределение концентрации ионов вблизи поверхности заряженной мембраны [68]. При расчетах для плотности отрицательного заряда было взято значение, соответствующее ситуации, когда заряжены примерно 20% липидных молекул; концентрация соли в объеме раствора равна $100 \text{ мМ } C^+ A^-$ или $9 \text{ мМ } C^{2+} A^{2-}$. Отметим, что вблизи поверхности мембраны концентрация катионов увеличивается, а анионов — уменьшается. Концентрация A^{2-} около мембраны очень мала и поэтому на рисунке не указана.

где $C(x)$ и $\Psi(x)$ — концентрация иона и электрический потенциал на расстоянии x от поверхности мембраны, $C(\infty)$ — концентрация иона на бесконечном расстоянии от поверхности (концентрация в объеме), Z — валентность иона ($+2$, $+1$, -1 и т. д.), F — постоянная Фарадея. Потенциал 60 мВ при 25°C соответствует примерно десятикратному изменению концентрации иона. Отметим еще раз, что значительное влияние на концентрационный профиль оказывает входящий в показатель экспоненты заряд иона Z .

С влиянием поверхностного потенциала связывают целый ряд самых разнообразных наблюдаемых в эксперименте эффектов. Можно считать экспериментально доказанным, что под влиянием поверхностного мембранного потенциала Ψ_0 концентрация ионов в околосмембранном слое изменяется в соответствии с теорией Гюи—Чапмена. Это касается протонов, ионов металлов и органических ионов.

Локальное значение pH на поверхности мембраны

Концентрация ионов вблизи отрицательно заряженной поверхности мембраны выше, чем концентрация в объеме, которую измеряют с помощью pH-метра. Поэтому кажущееся значение pK_a любой группы на поверхности отличается от истинного pK_a . Это касается, в частности, и титруемых групп самих фосфолипидов [1471]. На рис. 7.8 приведены кривые титрования карбоксильных групп

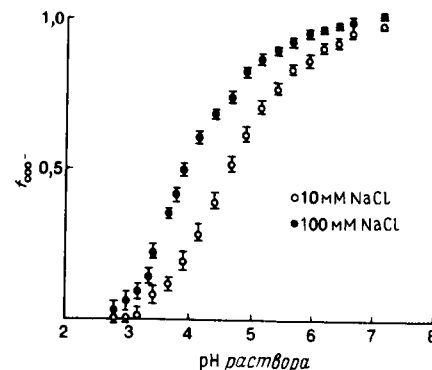


Рис. 7.8. Зависимость доли депротонированных карбоксильных групп фосфатидилсерина (f_{COO^-}) от значения pH в объеме (экспериментальные данные) [1471]. Результаты получены с использованием липосом, содержащих 14 мол.% фосфатидилсерина и 86 мол.% фосфатидилхолина. Кажущиеся значения pK_a для везикул в 10 мМ и 100 мМ NaCl равны 4,7 и 3,9 соответственно. Истинное значение pK_a равно 3,6, а влияние соли связано исключительно с увеличением локальной концентрации протонов на поверхности мембраны при низкой ионной силе.

фосфатидилсерина, включенного в фосфатидилхолиновые везикулы. Кажущееся pK_a составляет 4,7 при 10 мМ NaCl и 3,9 при 100 мМ NaCl. Это различие обусловлено не изменением истинного значения pK_a этой группы, а увеличением концентрации H^+ на поверхности мембраны при низкой ионной силе из-за увеличения Ψ_0 . Истинное значение pK_a по оценкам должно составлять 3,6, а зависимость pK_a от концентрации ионов очень хорошо описывается теорией Гюи—Чапмена. Локальное значение pH вычисляли по уравнению (7.18), приняв $x = 0$. Близкие результаты были получены с использованием помещенных на поверхность мембраны pH-индикаторов [1502]. Было показано, что значение локального околосмембранного pH отличается от pH в объеме на величину, предсказываемую теорией Гюи—Чапмена.

Дополнение 7.1. Истинные и кажущееся значения pK_a группы на поверхности мембраны

Константа диссоциации pK_a для протонирования группы (A^-) на поверхности мембраны определяется следующим образом:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]_{\text{поверхн}}}{[HA]} = \frac{[A^-][H^+]_{\text{объемн}} e^{-F\Psi_0/RT}}{[HA]}, \quad (7.19)$$

$$-\log K_a = -\log \frac{[A^-][H^+]_{\text{объемн}}}{[HA]} + \frac{F\Psi_0}{2,303RT}, \quad (7.20)$$

$$pK_a(\text{ист}) = pK_a(\text{каж}) + \frac{F\Psi_0}{2,303RT}, \quad (7.21)$$

$$\text{где } K_a(\text{каж}) = \frac{[A^-][H^+]_{\text{объемн}}}{[HA]}. \quad (7.22)$$

Связывание ионов металлов [953]

Физиологическая значимость взаимодействия фосфолипидов с ионами металлов, в частности с Ca^{2+} , не вызывает сомнений, и таким взаимодействиям было посвящено значительное число исследований. Для ответа на вопрос о том, как ионы металлов связываются с фосфолипидным бислоем и изменяют структуру мембраны, был привлечен целый ряд экспериментальных методов, в частности калориметрия, рамановская и инфракрасная спектроскопия, дифракция нейтронов и рентгеновских лучей, ^{31}P -ЯМР и 2H -ЯМР. В

табл. 7.2 приведены истинные константы диссоциации для некоторых катионов металлов, связанных с кислыми или цвиттерионными липидами. Некоторые из этих величин получали, регистрируя изменение поверхностного потенциала при связывании ионов металлов с фосфолипидными везикулами. Связывание катионов приводит к уменьшению плотности отрицательных зарядов в случае кислых фосфолипидов либо к увеличению плотности положительных зарядов в случае везикул из цвиттерионных липидов. И в той и в другой системах для анализа данных применима теория Гюи—Чапмена. Истинные константы связывания рассчитывали, исходя из концентрации свободных ионов вблизи поверхности мембраны, которая в свою очередь зависит от поверхностного потенциала, а саму константу диссоциации определяли из уравнения, аналогичного (7.19). Здесь стоит остановиться на нескольких моментах.

1. Одновалентные ионы, например натрий, действительно связываются с кислыми фосфолипидами, но с низким сродством.

2. Истинное сродство Ca^{2+} к поверхности цвиттерионных фосфолипидных везикул близко или чуть меньше, чем к поверхности кислых фосфолипидов [27]. Более сильное связывание Ca^{2+} с кислыми фосфолипидами обусловлено не большим сродством к ним Ca^{2+} , а скорее всего электростатическим эффектом более высокой плотности отрицательных зарядов, приводящим к возрастанию локальной концентрации Ca^{2+} на поверхности [894, 895].

3. Связывание как одно- [269], так и двухвалентных [122, 12] катионов, по-видимому, почти не влияет на конформацию полярных

Таблица 7.2. Истинные константы диссоциации комплексов катионов металлов с некоторыми фосфолипидами¹⁾

Фосфолипид	Катион		
	Ca^{2+} , мМ	Mg^{2+} , мМ	Na, М
Фосфатидилхолин	72—333	500	—
Фосфатидилэтноламин	333	500	—
Фосфатидилглицерол	50—118	167	1,4
Фосфатидилсерин	83	130	1,6
Кардиолипин	65	—	1,3

¹⁾ Данные взяты из работ [953, 27, 376, 894, 895]. Условия измерений во всех случаях были одинаковыми.

головек фосфолипидов, по крайней мере для фосфатидилхолина и фосфатидилглицерола. При связывании с фосфатидилсерином наблюдается иммобилизация карбоксильных групп [340].

4. Обычно Ca^{2+} связывается с фосфолипидами в стехиометрии 1:1 [47], хотя в случае фосфатидилхолина один ион Ca^{2+} связывается с двумя молекулами липида [27]. По-видимому, образуется и комплекс со стехиометрией 1:2, когда в результате связывания металла происходит агрегация мембран; при этом двухвалентный катион может служить мостиком между двумя плотно прижатыми поверхностями мембраны [953].

5. Связывание Ca^{2+} может приводить к изменению физического состояния липида [1354]. Например, связывание Ca^{2+} с фосфатидилсерином или фосфатидной кислотой может сопровождаться переходом бислоя в фазу геля [602, 175], а при взаимодействии с кардиолипином стабилизируется гексагональная фаза. Если везикулы состоят из смеси кислых и цвиттерийонных липидов, то связывание с Ca^{2+} вызывает латеральное разделение фаз [538]; при этом могут образовываться обширные домены в однослойных везикулах [607].

6. Свои преимущества дает связывание фосфолипидов с Mn^{2+} , поскольку этот парамагнитный ион изменяет спектр ^{31}P -ЯМР. Эти изменения зависят от локальной концентрации Mn^{2+} и, следовательно, могут использоваться для измерения поверхностного потенциала [948].

7. С поверхностью кислых бислоев прочно связываются также поликатионы, например поли-(L-лизин) [304] или гентамицин [220].

Дзета-потенциал и электрокинетические явления

Если заряженные везикулы поместить в электрическое поле, то они будут перемещаться по направлению к электроду, заряд которого противоположен по знаку заряду везикул. Электрофоретическая подвижность везикул определяется так называемым дзета-потенциалом [952], который равен электрическому потенциалу между объемом раствора и так называемой плоскостью Гельмгольца, параллельной плоскости мембраны. Эта плоскость отделяет плотную часть двойного электрического слоя, которая перемещается в электрическом поле вместе с мембраной и находится на расстоянии около $2 \text{ \AA}$ от заряженной поверхности везикулы. Таким образом, величина дзета-потенциала меньше, чем величина поверхностного потенциала (см., например, рис. 7.5), и связана с поверхностным потенциалом соотношением, определяемым теорией Гюи—Чапмена. Измерение дзета-потенциала лежит в основе одного из стандартных методов оценки поверхностного потенциала и может использоваться для изучения связывания ионов с поверхностью фосфолипидных везикул [954]. На электрофоретическую подвижность влияет также

наличие выступающих над поверхностью бислоя заряженных нелипидных мембранных компонентов, например белков или ганглиозидов [948], и с помощью электрокинетических методов можно получить определенную информацию о распределении зарядов вблизи поверхности везикул.

Связывание гидрофобных ионов и мембранных зондов

Наличие поверхностного потенциала может повлиять на связывание с поверхностью мембраны гидрофобных ионов и амфифильных мембранных зондов. Это позволяет использовать некоторые зонды в качестве индикаторов поверхностного потенциала. На рис. 7.9 приведены структурные формулы некоторых зондов. Для всех этих соединений интенсивность спектрального сигнала можно соотнести с количеством связанного с мембраной зонда и, следовательно, с величиной поверхностного потенциала. Такие зонды применяли для изучения многих заряженных фосфолипидных везикул

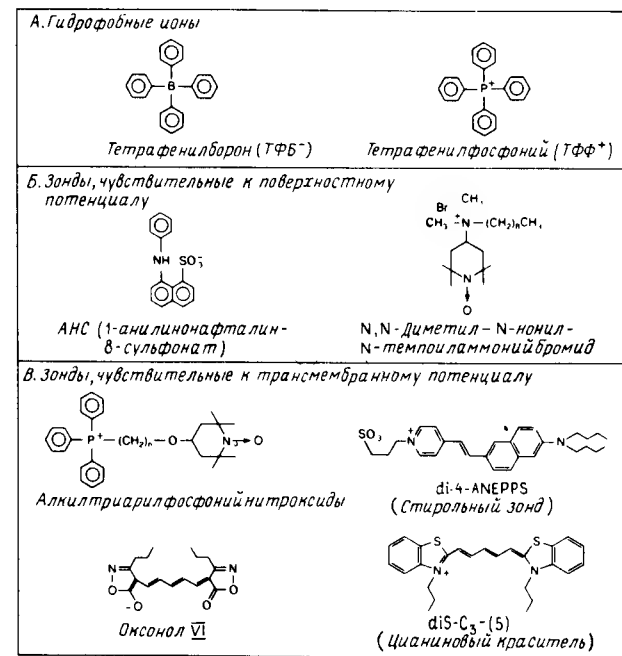


Рис. 7.9. Структурные формулы некоторых зондов, используемых при изучении электрических эффектов в мембранах (подробности см. в тексте и в цитируемой литературе).

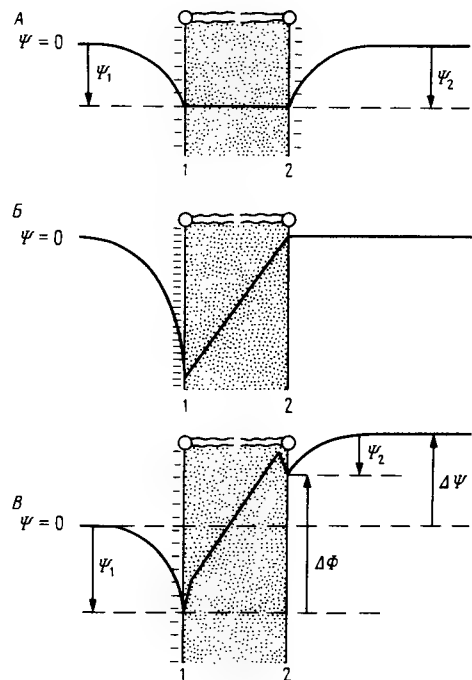


Рис. 7.10. Трансмембранные профили потенциальной энергии, иллюстрирующие влияние поверхностного заряда на трансмембранный потенциал. В вариантах *А* и *Б* дипольный потенциал не учитывался. *А*. Плотности отрицательного заряда на обеих поверхностях бислоя одинаковы, идентичны и поверхностные потенциалы (ψ_1 , ψ_2) по обе стороны мембраны, при этом трансмембранный потенциал равен нулю. *Б*. Одна сторона мембраны несет значительный поверхностный заряд, а другая не заряжена. В этом случае между двумя поверхностями бислоя возникает разность потенциалов, однако разность потенциалов между разделяемыми мембраной объемами раствора равна нулю. *В*. Одна сторона мембраны несет отрицательный заряд, а другая не заряжена; в этом случае возникает трансмембранная разность потенциалов. В этом варианте схема учитывает также и потенциал диполей внутри бислоя. Видно, что потенциал внутри мембраны более положительный, а близ границ раздела с обеих сторон создаются два локальных минимума энергии для анионов. $\Delta\psi$ — трансмембранный потенциал, ψ_1 и ψ_2 — поверхностные потенциалы, $\Delta\phi$ — разность потенциалов между поверхностями бислоя.

[948, 1409, 176]. Исследование с их помощью биомембран более проблематично, поскольку спектральные характеристики зонда могут зависеть не только от поверхностного потенциала, но и от рН или трансмембранного потенциала, что сильно затрудняет интерпретацию наблюдаемых спектральных изменений. В качестве примера можно привести связывание с митохондриями АНС (рис. 7.9,

[1228]) и изменение спектральных характеристик нейтрального красного при связывании с субмитохондриальными частицами [309].

На рис. 7.10, *А* представлен профиль электрического потенциала для мембраны, обе поверхности которой отрицательно заряжены. При наличии на мембране поверхностного потенциала увеличивается концентрация в этой мембране таких гидрофобных катионов, как ТФФ⁺ (рис. 7.9) или комплекс К⁺-валиномицин (рис. 7.12). Это связано с тем, что локальная концентрация ионов вблизи поверхности мембраны больше, чем их концентрация в объеме. Напомним, что коэффициент проницаемости может быть представлен в виде произведения коэффициента распределения β на константу скорости перемещения иона через мембрану k [уравнение (7.12)], поэтому из-за большой величины β проницаемость отрицательно заряженной мембраны для гидрофобных катионов будет выше, чем незаряженной. Зависимость проводимости мембраны от поверхностного заряда удовлетворительно описывается уравнением Гюи—Чапмена для поверхностного потенциала [952].

Заметим, что потенциал внутренних диполей может влиять как на связывание гидрофобных ионов с поверхностью бислоя, так и на константы скорости трансмембранного транспорта (разд. 7.3.2, табл. 7.1), в то время как эффект симметричного поверхностного потенциала на проницаемость обусловлен исключительно его влиянием на коэффициент распределения. В случае асимметричного распределения поверхностных зарядов ситуация усложняется (рис. 7.10, *Б*). Как уже отмечалось в гл. 4, подобное асимметричное распределение липидов — явление отнюдь не редкое. В этом случае существующий на мембране градиент потенциала будет затруднять перенос катионов из водной фазы 1 в фазу 2 и облегчать перенос катионов в противоположном направлении. В следующем разделе мы рассмотрим, какой вклад вносит трансмембранный потенциал в общий профиль электрической энергии мембраны.

7.4. Трансмембранный потенциал

Трансмембранный потенциал по определению есть разность электрических потенциалов между двумя водными фазами, разделенными мембраной. Связь между трансмембранным потенциалом ($\Delta\psi$) и поверхностными потенциалами ψ_1 и ψ_2 графически представлена на рис. 7.10, *В*. Из схемы видно, что разность потенциалов между двумя поверхностями мембраны $\Delta\phi$ может отличаться от $\Delta\psi$ из-за асимметричного распределения заряда между двумя поверхностями бислоя. Любая находящаяся внутри мембраны заряженная группа будет перемещаться в поле с потенциалом $\Delta\phi$. $\Delta\psi$ называют также потенциалом покоя, и именно эту величину, если удастся, измеряют парой электродов.

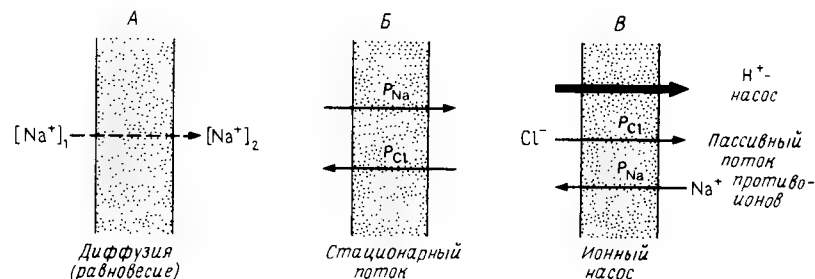


Рис. 7.11. Схема, иллюстрирующая три способа генерации трансмембранного потенциала. *In vivo* диффузия ионов через биомембраны осуществляется с участием белковых переносчиков. *А.* Если мембрана проницаема только для одного-единственного иона, то возникает трансмембранный потенциал, величину которого можно найти из уравнения Нерста. *Б.* Стационарный поток ионов также может привести к образованию трансмембранного потенциала, величина которого определяется из уравнения Гольдмана—Ходжкина—Каца. *В.* Ионы через мембрану могут транспортироваться с помощью энергозависимого ионного насоса, но одновременно с этим для поддержания суммарной электронейтральности через мембрану должны перемещаться другие ионы. Если диффузия противоионов достаточно быстрая (проницаемость мембраны для них высока), то разделения зарядов и образования трансмембранного потенциала в результате работы ионного насоса наблюдаться не будет.

Создать трансмембранный потенциал можно несколькими способами. Схематически они изображены на рис. 7.11.

1. *Равновесные условия.* Если мембрана проницаема для какого-то определенного иона, например Na^+ , и непроницаема для других, то на ней может возникнуть *диффузионный потенциал*, пропорциональный логарифму отношения концентраций проникающего иона по одну и другую стороны мембраны. Диффузия иона через мембрану сопровождается трансмембранным разделением зарядов, и создаваемая при этом разность потенциалов препятствует дальнейшей диффузии. Заряд, который нужно переместить через мембрану для создания на ней данного значения $\Delta\psi$, можно вычислить исходя из емкости мембраны [уравнение (7.15)]. Для создания $\Delta\psi = 100$ мВ нужно перенести примерно один заряд на 250 молекул фосфолипида. Ясно, что поверхностная плотность заряда при этом изменится крайне незначительно.

В равновесии $\Delta\psi$ определяется уравнением Нернста:

$$(\psi_1 - \psi_2) = \Delta\psi = - \frac{RT}{2,303FZ} \log \frac{[\text{Na}^+]_1}{[\text{Na}^+]_2}. \quad (7.23)$$

Это же уравнение следует использовать в случае переноса иона с валентностью Z (для Na^+ $Z = 1$). Проницаемость биомембран для ионов связана с работой специфических ионных каналов (см. сле-

дующую главу). Ее можно искусственно увеличить с помощью специфических переносчиков ионов или ионофоров, например K^+ -валиномицина.

2. *Стационарный диффузионный ионный ток* [633]. Если мембрана проницаема для нескольких ионов, то все они будут перемещаться через нее. При этом в стационарных условиях из-за различий в коэффициентах проницаемости для разных ионов может возникнуть трансмембранная разность потенциалов. Иными словами, разделение зарядов на мембране в такой ситуации будет связано с тем, что одни ионы диффундируют через мембрану быстрее других. Уравнение, описывающее данную ситуацию, называется уравнением Гольдмана—Ходжкина—Каца и для случая двух ионов (Na^+ и Cl^-) имеет следующий вид:

$$\Delta\psi = - \frac{RT}{2,303F} \log \left(\frac{P_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_1 + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_2}{P_{\text{Na}}[\text{Na}^+]_2 + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}^-]_1} \right). \quad (7.24)$$

Перемещение ионов будет продолжаться до тех пор, пока не установится равновесие.

3. *Активный перенос ионов.* Трансмембранное разделение зарядов может происходить и с помощью процессов активного транспорта. Многие ферменты катализируют реакции, сопряженные с векторным переносом зарядов через бислой. В качестве примеров можно привести разнообразные АТФ-зависимые ионные насосы, например Ca^{2+} -АТФазу (разд. 8.4.1) или цитохром *c*-оксидазу (разд. 8.5.1), представляющую собой протонный насос. Энзимология этих систем будет кратко описана в следующей главе. Здесь мы отметим лишь, что катализируемые этими ферментами реакции являются электрогенными, т. е. сопровождаются переносом зарядов через бислой. Очевидно, в такой системе должен существовать какой-то трансмембранный нейтрализующий ионный поток. В системе, представленной на рис. 7.11, таким потоком является пассивный контртранспорт ионов Cl^- , возникающий при работе протонного насоса. Как и в случае пассивных ионных потоков, скорость потока противоионов будет меньше, чем скорость активного процесса, и в результате суммарный поток ионов через бислой не будет электронейтральным и на мембране возникнет разность потенциалов $\Delta\psi$. Если проницаемость бислоя для нейтрализующих ионов сделать достаточно большой, то разделения зарядов уже не будет. На этом принципе основано использование ионофоров для устранения трансмембранного электрического потенциала, создаваемого как на биологических мембранах, так и в модельных системах.

7.4.1. ИЗМЕРЕНИЕ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА [54]

Величину трансмембранного потенциала лучше всего измерять

с помощью двух электродов, помещенных по разные стороны мембраны. Однако этот способ применим лишь для плоских модельных мембранных систем и некоторых крупных клеток [140]. Обычно же приходится измерять потенциал на мембране либо протееолипсомом, либо клеток или органелл, например митохондрий или хлоропластов. Для этих случаев разработано несколько методов.

1. *Распределение ионов в соответствии с уравнением Нернста* (7.23). В систему добавляют ион, способный проникать через мембрану, и он перераспределяется между внешней средой и внутренним объемом в соответствии с уравнением Нернста. На этом принципе основано использование в качестве молекулярных зондов таких гидрофобных ионов, как TFF^+ [1255] или ^{86}Rb -валиномицин. Чтобы определить трансмембранный потенциал, нужно знать концентрацию иона внутри везикулы, органеллы или клетки, что нередко превращается в серьезную проблему. Ошибки в измерении $\Delta\psi$ могут, в частности, возникнуть, если большие количества зонда связываются с мембранами клетки или если неправильно определен внутренний объем.

2. *Спин-меченные ЭПР-зонды*. Для этой цели используют несколько зондов [176, 177] (см. рис. 7.9) — гидрофобных ионов, к которым ковалентно пришта параманитная нитроксильная группа. Концентрацию зонда, связанного с мембраной, легко определить из спектра ЭПР; при образовании на мембране потенциала зонд перераспределяется между фазами, и по изменению его концентрации в мембране можно оценить величину $\Delta\psi$. Изменение концентрации мембраносвязанного зонда обусловлено тем, что для внутривезикулярного пространства отношение площади поверхности к объему гораздо больше, чем для внешнего раствора [177].

3. *Оптические молекулярные зонды*. Спектральные характеристики многих оптических зондов зависят от трансмембранного потенциала. Из наиболее распространенных назовем флуоресцентные производные мероцианина, оксонола и цианиновые красители [1534, 230, 54]. Все эти соединения связываются с мембраной, и, по-видимому, в основе их реакции на изменения трансмембранного потенциала может лежать несколько механизмов [1511]. Чаще всего взаимодействие электрического диполя, каким является зонд, с электрическим полем приводит к изменению ориентации диполя в бислое. В ряде случаев изменение степени агрегации зонда в бислое влечет за собой изменение квантового выхода флуоресценции. Большинство зондов применяют для определения трансмембранного потенциала, имеющего знак минус внутри везикулы, однако некоторые красители, например оксонолы, используются при обратной полярности потенциала [782].

К зондам другого типа, спектр поглощения которых чувствителен к трансмембранному потенциалу, относятся соединения сти-

рольной природы, образующие в мембране конъюгированные структуры [443]. Изменение их спектров поглощения при наложении потенциала обусловлено так называемым явлением электрохромизма [722]. Переход молекулы зонда из основного состояния в возбужденное при поглощении кванта света сопровождается перераспределением электронов. На энергию электронного перехода влияет градиент потенциала, вектор которого параллелен направлению этого смещения заряда. Подобные электрохромные изменения спектра наблюдаются также для природных пигментов фотосинтетических мембран — каротиноидов [722]. Преимущество зондов этого типа состоит в том, что соответствующие реакции происходят очень быстро и не зависят от степени агрегации или распределения зонда. Все эти свойства делают такие зонды особенно полезными для быстрых кинетических измерений.

7.4.2. КОНЦЕПЦИЯ ЭНЕРГИЗОВАННОЙ МЕМБРАНЫ [1065]

Термин «энергизованная мембрана» трактуется обычно довольно широко, но в действительности он означает лишь, что поток ионов через бислой может использоваться для совершения работы. Чаще всего ионный поток создают протоны (пример — митохондрии или хлоропласты), и разность электрохимических потенциалов протонов ($\bar{\mu}_{\text{H}^+}$) между двумя разделенными бислоем фазами называется протондвижущей силой.

$$\text{Сторона 1: } \bar{\mu}_{\text{H}^+,1} = 2,303RT \log [\text{H}^+]_1 + F\psi_1,$$

$$\text{Сторона 2: } \bar{\mu}_{\text{H}^+,2} = 2,303RT \log [\text{H}^+]_2 + F\psi_2,$$

$$\text{Разность (1 минус 2): } \Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+} = 2,303RT \log [\text{H}^+]_1/[\text{H}^+]_2 + F\Delta\psi,$$

$$\text{Протондвижущая сила (мВ): } \frac{\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}}{F} = \Delta\psi - \frac{2,303RT}{F} \Delta\text{pH}, \quad (7.25)$$

где $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+} = (\bar{\mu}_{\text{H}^+,1} - \bar{\mu}_{\text{H}^+,2})$ — разность электрохимических потенциалов протонов, выраженная в Дж/моль; частное от деления этой величины на постоянную Фарадея будет иметь размерность мВ.

$$\Delta\psi = (\psi_1 - \psi_2) \text{ относительно наружного раствора,}$$

$$\Delta\text{pH} = (\text{pH}_1 - \text{pH}_2) \text{ относительно наружного раствора.}$$

При 30 °C

$$\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+} \text{ (мВ)} = \Delta\psi - 60\Delta\text{pH}. \quad (7.26)$$

Протондвижущая сила является мерой изменения свободной энергии при переносе протонов с одной стороны мембраны на другую. В митохондриях и фотосинтетических системах за счет протондви-

жущей силы происходит синтез АТР, но она может использоваться и системами транспорта растворенных веществ (гл. 8). Все сказанное выше детально рассматривается в рамках хемиосмотической теории [1065].

Для нахождения μ_{H^+} нужно знать как $\Delta\psi$, так и ΔpH . Методы определения $\Delta\psi$ мы обсудили выше. ΔpH обычно оценивают из данных по распределению по обе стороны мембраны слабых кислот или оснований [54]. Их нейтральные формы проникают через липидный бислой, а непроницающие заряженные формы накапливаются в зависимости от pH с той или другой стороны мембраны. Можно использовать для этой цели как радиоактивные производные, так и оптические зонды [131]. Один из наиболее часто используемых для измерения ΔpH зондов — 9-аминоакридин — аккумулируется внутри везикул с кислым содержимым, что ведет к тушению флуоресценции зонда.

7.5. Проницаемость липидных бислойных мембран для ионов [311]

Как мы уже говорили, бислой создает весьма высокий энергетический барьер для ионов металлов. Коэффициент проницаемости однослойных везикул для Na^+ составляет всего 10^{-12} – 10^{-14} см/с (см. табл. 7.1), но даже столь малая величина на порядок выше скорости, предсказываемой исходя из модели растворения—диффузии, если воспользоваться уравнением Борна для оценки энергии, необходимой для перемещения иона из водной фазы в центр мембраны. Механизм переноса ионов через липидный бислой пока неясен, но в литературе обсуждается несколько конкурирующих теорий, в основе которых лежит предположение о существовании дефектов упаковки молекул фосфолипидов в бислое. Постулируется, что эти дефекты возникают спонтанно, подобно флуктуирующим полостям или кинкам, либо формируются на границе раздела сосуществующих в мембране жидкокристаллической фазы и фазы геля. Ионная проницаемость в общем случае максимальна при температуре фазового перехода гель — жидкий кристалл, но это не так для воды и протонов (см. ниже). Следует напомнить, что стационарный поток ионов через бислой должен быть электронейтральным, т. е. для поддержания нейтральности поток одних ионов должен быть сопряжен с потоком других ионов.

Как бы то ни было, ясно, что бислой представляет собой труднопреодолимый барьер для простых анионов и катионов. Однако, как уже говорилось, ионы большего радиуса из-за уменьшения энергии Борна будут легко проникать через мембрану. Довольно легко могут пересекать бислой и гидрофобные ионы.

7.5.1. ПРОНИЦАЕМОСТЬ ДЛЯ ПРОТОНОВ [310, 562]

Как показывают измерения на модельных мембранах, проницаемость липидного бислоя для протонов исключительно высока. Экспериментально отличить проницаемость для протона от проницаемости для гидроксила довольно трудно, поэтому в литературе ее обозначают H^+/OH^- (например, так, как в табл. 7.1). В дальнейшем эту проницаемость мы будем для простоты называть протонной. Приводимые в литературе значения коэффициента проницаемости для протона варьируют в довольно широких пределах, обычно от 10^{-4} до 10^{-8} см/с. Столь значительный разброс объясняют экспериментальными различиями в размерах везикул, в величине создаваемого трансмембранного градиента pH, в степени ненасыщенности липидов [1139]. Ясно тем не менее, что проницаемость для протона по крайней мере в 10^6 раз выше, чем для других простых ионов, причем это относится как к биомембранам, так и к модельным системам [563].

Приведенные данные однозначно указывают на существование специального механизма протонной проницаемости. Это, в частности, подтверждает тот факт, что скорость транспорта протонов не определяется простым электростатическим барьером в мембране [1139]. Природа этого явления неизвестна. Согласно одной из моделей, в мембране имеются временные пересекающие всю толщу бислоя цепочки из молекул воды, соединенных водородными связями; по этим цепочкам по эстафетному механизму и осуществляется перенос протонов [1049, 310]. Однако прямых данных о существовании таких цепочек воды пока нет. В других работах постулируется (и этому есть экспериментальные подтверждения), что аномально высокая проводимость фосфолипидных бислоев для протонов обусловлена в основном присутствием в мембране небольших количеств слабых кислот, например свободных жирных кислот, которые при физиологических pH выступают в роли переносчиков протонов [562]. Однако расчеты показывают, что всю аномально большую протонную проводимость липосом эта гипотеза объяснить не может [310].

Было показано также, что протоны способны быстро диффундировать вдоль границы раздела мембрана—раствор и протонировать анионные формы адсорбированных на поверхности мембраны слабых кислот [730]. При этом околоповерхностный барьер для быстрого установления равновесия по протонам между наружным раствором и протонированными группами на поверхности мембраны отсутствует.

Поскольку перенос протонов через бислой является ключевым процессом для большинства биоэнергетических систем [1065], вопрос о механизме диффузионной проницаемости мембраны для

протонов представляет особый интерес [789]. В экспериментальном плане протонная проводимость имеет большое значение при изучении реконструированных в фосфолипидные везикулы протонпереносящих белков. Исследования показывают, что встраивание белков в такие системы почти не влияет на протонную проводимость [1086, 1325], однако важным фактором, способным изменить пассивную проницаемость мембраны для протонов, могут служить протвиоины [1325] и величина трансмембранного потенциала [492, 789].

Другой важный для биоэнергетики вопрос заключается в том, каким образом происходит диффузия протона из одного места в другое на поверхности мембраны. Например, изображенный на рис. 6.5 протонный цикл предполагает диффузию протонов от протонпереносящих ферментов к АТР-синтазам. Весь вопрос в том, устанавливается ли равновесие между этими протонами и наружным раствором или существует некий локализованный путь переноса протонов вдоль поверхности или внутри мембраны. Как уже упоминалось, отсутствие околосмембранного барьера для быстрого уравнивания протона между локализованными на поверхности бислоя протолитическими группами и раствором доказано экспериментально [730]. Однако в серии изящных исследований было показано, что латеральная диффузия протонов вдоль поверхности фосфолипидного монослоя может осуществляться в 20 раз быстрее, чем диффузия через объем [1175]. Предполагается, что диффузия идет посредством эстафетной передачи вдоль двумерной сетки водородных связей, образованных полярными головками фосфолипидов и молекулами воды на поверхности мембраны. Биологическую значимость обнаруженного явления, однако, еще предстоит выяснить, а с выводами согласны далеко не все исследователи [730].

7.5.2. ИОНОФОРЫ [1176, 1065]

Ионофоры — это довольно разнородная группа соединений, увеличивающих проницаемость мембран для ионов. Один ионофоры, например грамицидин А и аламетицин, формируют в бислое каналы (разд. 8.1.5), другие образуют стехиометрические комплексы с катионами и тем самым облегчают транспорт этих ионов через липидный бислой. Ионофоры являются весьма полезными инструментами в мембранных исследованиях, особенно при изучении биоэнергетических или иных зависимых от ионного градиента систем. Поскольку такие ионофорно-катионные комплексы могут проявлять довольно высокую специфичность к определенным ионам, с их помощью можно избирательно манипулировать ионными градиентами и электрическим потенциалом на мембране. Некоторые комплексы ионофора и катиона не заряжены, и катион переносится в

нейтрализованной форме. Другие комплексы заряжены и диффундируют через бислой подобно уже обсуждавшимся гидрофобным ионам. Ниже кратко охарактеризованы некоторые наиболее часто используемые ионофоры (см. рис. 7.12).

СССР (карбонилцианид-*м*-хлорфенилгидразон)

СССР и близкий к нему FCCP (карбонилцианид-*п*-трифторметоксифенилгидразон) представляют собой слабые кислоты. Протонированная форма электронейтральна и, как показано, легко проникает через мембрану ($P \approx 17$ см/с), в то время как проницаемость депротонированной (анионной) формы составляет $\sim 1\%$ от проницаемости формы нейтральной [729]. Растворимость анионных форм этих и других протонаторов в гидрофобной области бислоя обуславливается несколькими причинами [730]. Отрицательный заряд этих молекул делокализован, а благодаря большому ионному радиусу уменьшается энергия Борна [уравнение (7.17)]. Кроме того, потенциал диполей, ориентированных положительным зарядом внутрь бислоя, стабилизирует анионы в мембране (рис. 7.4). И наконец, ионофор в мембране стабилизируют гидрофобные группы молекулы.

СССР, FCCP и другие слабые кислоты эффективно увеличивают проницаемость мембраны для протонов, что позволяет достичь электрохимически равновесного распределения протонов по обе стороны бислоя.

Валиномицин

Это циклодеспептид, образующий с одновалентными катионами (предпочтительно с K^+) комплекс со стехиометрией 1:1. Структура комплекса напоминает ячейку, в центре которой находится ион калия, стабилизированный взаимодействием с карбонилами эфирных групп (рис. 7.12). Комплекс K^+ -валиномицин является гидрофобным ионом и с легкостью проникает через бислой. С помощью этого ионофора можно создавать калиевый диффузионный потенциал на мембране везикул, концентрация K^+ в которых отличается от концентрации снаружи. В системе, где трансмембранный потенциал создается с помощью какого-либо активного процесса, K^+ -валиномицин будет устранять электрическую составляющую $\Delta\psi$, не влияя непосредственно на величину ΔpH .

Нигерицин и моненсиин

Это полиэферы, имеющие одну отрицательно заряженную карбоксильную группу [1464]. Как и валиномицин, они образуют ком-

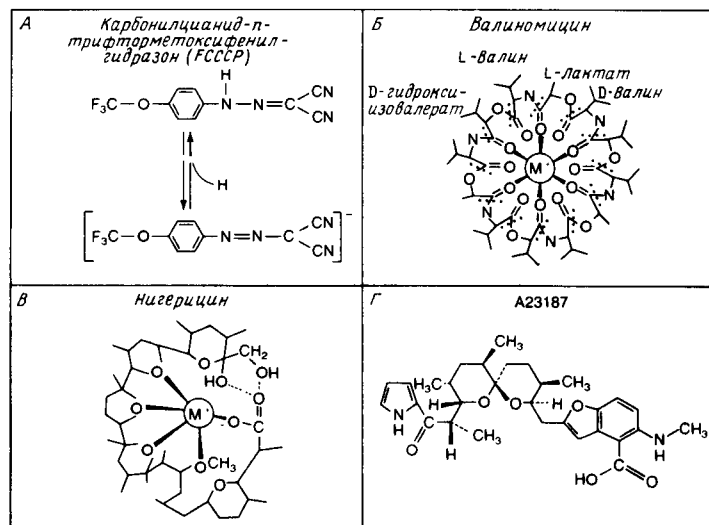


Рис. 7.12. Структура четырех ионофоров (обсуждение см. в тексте) [1176]. Жирными линиями на рис. Б и В показаны связи ионов металлов с молекулами ионофоров (данные рентгеновской кристаллографии).

плексы с одновалентными катионами в стехиометрии 1:1, но эти комплексы электронейтральны. Нигерицин (рис. 7.12) селективно связывает K^+ , а моненсин — Na^+ . Эти ионофоры также могут с успехом проникать через бислои в нейтральной протонированной форме, поэтому их используют для ускорения обмена H^+ на Na^+ (моненсин) или H^+ на K^+ (нигерицин) через мембрану. Добавление рассматриваемых ионофоров к везикулам приводит к выравниванию градиентов H^+ и Na^+ (или K^+). Чаще всего их применяют для рассеивания ΔpH на мембране. Поскольку при суммарной реакции обмена сохраняется электронейтральность, на $\Delta \Psi$ это прямым образом не сказывается.

A23187

Этот катионный переносчик содержит заряженную карбоксильную группу (рис. 7.12) и с высокой избирательностью связывает двухвалентные катионы [337]. Обычно A23187 используют как Ca^{2+} -ионофор. Вероятно, при своей работе этот ионофор образует растворимый в бислое нейтральный комплекс, состоящий из двух молекул A23187 и одной молекулы Ca^{2+} ; существование таких комплексов со стехиометрией 2:1 доказано экспериментально [337].

7.6. Резюме

Основная функция любой биологической мембраны состоит в создании барьера с селективной проницаемостью между разделяемыми ею водными компартментами. Тонкий гидрофобный центральный слой в мембране является очень эффективным барьером для неорганических ионов, но он в той или иной степени проницаем для неполярных веществ. Скорость проникновения незлектролитов через бислой зависит от растворимости данного вещества в бислое, определяемой исходя из данных о коэффициенте его распределения между водой и органическими растворителями. Проницаемость модельных мембран для воды неплохо согласуется с растворимостью воды в органических растворителях, однако через некоторые биологические мембраны вода может проникать также по трансмембранным каналам белковой природы.

Липидный бислой является довольно хорошим барьером для неорганических ионов, однако проницаемость модельных и биологических мембран для протонов по не совсем понятным причинам необычайно высока.

Органические ионы или органические хелатные комплексы, содержащие неорганические ионы, могут растворяться в углеводородной области бислоя благодаря своим гидрофобным свойствам и большим размерам. К молекулам такого типа относятся и ионофоры.

Электрические свойства биологических мембран довольно хорошо изучены. Проницаемость биологических мембран для неорганических ионов практически полностью обусловлена работой трансмембранных ионных каналов белковой природы. Образующийся при разделении зарядов трансмембранный потенциал связан с электрической емкостью мембраны, которая практически одинакова для модельных липидных бислоев и биологических мембран. Существование зарядов на поверхности мембраны создает дополнительный поверхностный потенциал, который может весьма существенным образом изменять концентрацию любого заряженного соединения в непосредственной близости от мембраны. Это в свою очередь может сказаться на каталитических свойствах мембраносвязанных ферментов.

ПОРЫ, КАНАЛЫ И ПЕРЕНОСЧИКИ

8.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Из данных, представленных в гл. 7, ясно, что фосфолипидный бислой является очень эффективным барьером для множества небольших растворимых молекул. Тем не менее через плазматическую мембрану, а также через мембраны, ограничивающие различные органеллы (например, митохондрии), постоянно транспортируются полярные вещества и ионы. Этот транспорт целиком опосредован белками, и для объяснения механизма переноса растворимых веществ через мембрану было предложено много моделей. В этой главе мы поставили перед собой задачу суммировать все данные, относящиеся к механизму проникновения вещества через биомембрану. В следующей главе рассматривается вопрос о передаче информации через мембрану; в ней также затрагиваются проблемы клеточной коммуникации, поверхностных рецепторов и преобразования сигналов. Материал этих двух глав взаимосвязан. Например, ответ на определенные сигналы (скажем, связывание молекулы с поверхностным рецептором клетки) быстро изменяет проницаемость мембраны к специфическим ионам, в результате чего изменяется трансмембранный потенциал и/или внутриклеточная концентрация ионов. Однако прежде чем обсуждать эти и другие возможные механизмы передачи сигналов, необходимо выяснить механизмы регуляции высвобождения и накопления молекул в различных компартментах.

Здесь будет полезно ввести несколько терминов, использующихся для характеристики белков или структур, участвующих в трансмембранном транспорте. В табл. 8.1 дается классификация транспортных белков. Прежде всего их подразделяют на *каналы* (или *поры*) и *переносчики*. Поры и каналы часто изображают в виде туннелей через мембрану, в которых места связывания транспортируемых растворимых веществ доступны с обеих сторон мембраны одновременно. Канальные белки не претерпевают никаких конформационных изменений в процессе переноса растворимых веществ с одной стороны мембраны на другую. Напротив, конформация переносчиков в процессе транспорта различных веществ изменяется.

Таблица 8.1. Классификация некоторых транспортных белков, основанная на механизме их действия и энергетике

I.	<i>Каналы</i>
A.	Потенциалзависимые каналы (<i>пример</i> : Na^+ -канал)
B.	Химически регулируемые каналы (<i>пример</i> : никотиновый ацетилхолиновый рецептор)
B.	Другие каналы (нерегулируемые, чувствительные к давлению и др.)
II.	<i>Переносчики</i>
A.	Пассивные унипортеры (<i>пример</i> : переносчик глюкозы из эритроцитарной мембраны)
B.	Активные переносчики
1.	Первичные активные переносчики
a.	Сопряженные с окислительно-восстановительными реакциями (<i>пример</i> : цитохром с-оксидаза)
b.	Сопряженные с поглощением света (<i>пример</i> : бактериородопсин)
в.	АТФазы (<i>пример</i> : Na^+/K^+ -АТФаза)
2.	Вторичные активные переносчики
a.	Симпортеры (<i>пример</i> : лактозопермеаза)
б.	Антипортеры (<i>пример</i> : белок полосы 3)

Переносимое вещество связывается с одной стороны мембраны, и для высвобождения его с другой стороны в переносчике должно произойти определенное конформационное изменение. При этом в любой момент времени место связывания вещества доступно только с одной стороны мембраны.

Каналы и поры также претерпевают конформационные изменения, однако последние регулируют лишь их открывание и закрывание и не касаются самого процесса переноса. Две основные группы каналов, приведенные в табл. 8.1, разделяются на каналы, работа которых регулируется изменением *напряжения электрического поля* или *химическим путем*. Каналы первого типа открываются или закрываются в ответ на изменение трансмембранного потенциала; наиболее изученными из них являются каналы электровозбудимых клеток, например нервных или мышечных [1425]. Каналы второго типа отвечают на действие специфических химических агентов; наиболее детально изученные из них — каналы, связывающие нейромедиаторы, например ацетилхолин. Так, никотиновый ацетилхолиновый рецептор при связывании с ним нейромедиатора переходит в открытую конформацию и пропускает одновалентные катионы.

Термины *пора* и *канал* обычно взаимозаменяемы, однако под порой чаще понимают некие неселективные структуры, которые различают вещества главным образом по размеру и пропускают все

достаточно малые молекулы. Под каналами чаще всего понимают ионные каналы, которые, как теперь известно, широко распространены во многих типах клеток, отличных от нервных и мышечных (например, в эпителиальных клетках [1592]).

Переносчики можно разделить на две группы: *пассивные* и *активные*. Мы будем использовать термин *пассивный переносчик* в том случае, когда при его участии осуществляется перенос через мембрану единственного типа веществ. Переносчики-унипортеры только увеличивают поток вещества, идущий без потребления энергии, т. е. по градиенту электрохимического потенциала. Такой процесс называется *облегченной диффузией*. Наиболее полно изученным пассивным переносчиком является переносчик глюкозы в эритроцитах.

Активные переносчики осуществляют перенос веществ через мембрану с затратами энергии, в результате эти вещества накапливаются с одной стороны мембраны. При этом транспорт вещества должен быть сопряжен с другим, запасующим свободную энергию процессом. Почти все *первичные активные переносчики* являются ионными насосами, в которых перемещение иона прямо сопряжено с поставляющей энергию химической или фотохимической реакцией. Примером ионного насоса является бактериородопсин, который для переноса протонов через мембрану использует энергию фотонов видимого света. В большинстве случаев ионные насосы являются *электрогенными*: при работе первичного насоса осуществляется перемещение заряда, в результате чего происходит разделение электрических зарядов и на мембране создается напряжение.

Первичные активные переносчики генерируют напряжение и создают трансмембранные ионные градиенты. *Вторичные активные переносчики* используют такие градиенты в качестве движущей силы для транспорта растворимых веществ. Наиболее полно охарактеризованным примером такого рода является белок — переносчик лактозы (лактозопермеаза) из *Escherichia coli*. Этот переносчик использует протонный электрохимический градиент, генерируемый дыхательной электронтранспортной цепью, в качестве движущей силы для накопления лактозы в клетке. Это пример *симпорта*, когда через мембрану одновременно переносятся два разных вещества (например, протоны и лактоза). *Антипортеры* осуществляют транспорт веществ в противоположных направлениях. Так, например, белок полосы 3 эритроцитов осуществляет сопряженный транспорт Cl^- и HCO_3^- в противоположных направлениях через эритроцитарную мембрану.

Термины *пермеаза*, *транслоказа* и *переносчик*, являющиеся синонимами, часто используют по отношению к транспортным белкам, отличным от первичных активных переносчиков. Обычно термин «пермеаза» применяют при описании бактериальных транс-

Таблица 8.2. Некоторые группы структурно родственных каналов и переносчиков

-
- | |
|---|
| 1. Потенциалзависимые ионные каналы: |
| Na^+ -канал |
| K^+ -канал |
| Ca^{2+} -канал (чувствительный к диэтилопиридину) |
| 2. Каналы, регулируемые нейромедиаторами: |
| Никотиновый ацетилхолиновый рецептор |
| Рецептор γ -аминомасляной кислоты |
| Рецептор глицина |
| 3. Митохондриальные переносчики: |
| Переносчик ADP/ATP |
| Переносчик H^+ -фосфата |
| Разобщающий белок (переносчик H^+/OH^-) |
| 4. Переносчики сахаров: |
| Переносчик глюкозы (клетки млекопитающих) |
| Переносчик H^+ -арабинозы (<i>E. coli</i>) |
| Переносчик H^+ -ксилозы из (<i>E. coli</i>) |
| 5. АТРАЗЫ E_1E_2 -типа, сопряженные с трансмембранным переносом ионов (см. также табл. 8.5) |
| H^+/K^+ -АТРаза (слизистая желудка млекопитающих) |
| Na^+/K^+ -АТРаза (плазматическая мембрана) |
| Ca^{2+} -АТРаза (саркоплазматический ретикулум) |
| H^+ -АТРаза (плазматическая мембрана) |
| K^+ -АТРаза (<i>S. faecalis</i>) |
-

портных белков. Термин «переносчик», по-видимому, лучше использовать по отношению к ионофорам или сходным с ними структурам (разд. 7.5.2), которые связываются с ионами и переносят их через бислой в составе комплекса.

Классификация транспортных белков, представленная в табл. 8.1, основана главным образом на энергетике и механизме транспорта растворимых веществ. Однако по мере установления аминокислотной последовательности все большего числа белков появляется возможность разработать другой принцип классификации транспортных белков — на основе их структурного сходства. В табл. 8.2 показано несколько структурно родственных групп каналов и транспортных белков. При этом белки, входящие в состав одной группы, могут выполнять разные функции. В качестве примера рассмотрим переносчик глюкозы млекопитающих и переносчик H^+ -арабинозы бактерий. Первый является унипортером, который может катализировать только облегченную диффузию глюкозы, в то время как второй способен сопрягать перенос ионов H^+ по протонному электрохимическому градиенту с активным транспортом другого вещества, арабинозы. Ясно, что природа может

приспособить одну и ту же структуру к выполнению различных функций. Мы еще столкнемся с этими вопросами в следующей главе при рассмотрении групп поверхностных клеточных рецепторов.

8.1.1. КАНАЛЫ И ПЕРЕНОСЧИКИ: РАЗНООБРАЗИЕ ФУНКЦИЙ

Функции ионных каналов и переносчиков весьма разнообразны; проиллюстрируем их на нескольких примерах. Так, регулируемые ионные каналы, участвующие в передаче сигнала, в ответ на определенный внешний стимул быстро изменяют мембранную проницаемость для определенного иона. При этом происходит изменение трансмембранного потенциала (гл. 9). К работе такого рода каналов предъявляется ряд требований. Во-первых, внешний сигнал должен вызывать быстрое переключение между открытым и закрытым состояниями канала. Необходимо также, чтобы быстро устанавливалось новое равновесие или стационарное значение мембранного потенциала. При этом очень существенна скорость процесса. Так, когда канал открыт, через бислой может проходить до 10^6 – 10^8 ионов в секунду. Такая величина потока является экспериментальным критерием, позволяющим отличить каналы от переносчиков (табл. 8.3). Столь большие ионные потоки означают, что открывание относительно малого числа каналов приводит к значительным быстрым изменениям электрических свойств мембраны. Рассмотрим на конкретном примере, как оценить время ответа мембраны на внешний сигнал.

Предположим, что мембрана с емкостью 1 мкФ/см^2 содержит некоторое число K^+ -каналов с проводимостью в открытом состоянии 20 пСм (определение единиц измерения проводимости см. в разд. 7.3). Проводимость, равная 1 пСм , эквивалентна $6 \cdot 10^6$ ион/с на 1 В , так что в нашем случае через каждый канал может пройти $1,2 \cdot 10^8$ ион/с на 1 В . Предположим, что на мембране существует K^+ -градиент с соотношением $[K^+]_{\text{внутри}}/[K^+]_{\text{снаружи}} = 52$. Когда K^+ -каналы закрыты, мембранная проницаемость по K^+ равна нулю и K^+ не участвует в образовании трансмембранного потенциала. При открывании каналов происходит перенос ионов K^+ по градиенту концентрации до тех пор, пока не установится новое стационарное распределение.

В результате диффузии ионов K^+ через мембрану происходит разделение зарядов. При этом достигается равновесное значение трансмембранного потенциала, которое можно определить из уравнения Нернста (см. разд. 7.4). Легко подсчитать, что в нашем случае оно составляет 100 мВ . Заряд, необходимый для поддержания этого потенциала, определяется емкостью C [уравнение (7.15)], составляющей всего лишь $\sim 10^{-12} \text{ моль/см}^2$ (примерно 1 заряд на 250

Таблица 8.3. Сравнение скоростей транспорта для некоторых систем¹⁾

Система	Скорость транспорта, с^{-1}
Каналы/поры	
Натриевый канал	$\sim 10^7$
Грамицидин А	$\sim 10^7$
Канал ацетилхолинового рецептора	$\sim 10^7$
Пермеазы	
H^+ -Лактозопермеаза <i>E. coli</i>	30
Переносчик глюкозы (эритроциты)	300
Анионный переносчик белок полосы 3 (эритроциты) ²⁾	100 000
Активные переносчики	
Бактериородопсин	50
Na^+ / K^+ -АТРаза ³⁾	450
Цитохром с-оксидаза	1000

¹⁾ Ссылки см. в тексте. Приведены приблизительные значения, поскольку они сильно варьируют в зависимости от экспериментальных условий. В данном случае условия были следующими: $0,1 \text{ М NaCl}$, 100 мВ [1386].

²⁾ Указана скорость обмена. Подробнее см. в тексте.

³⁾ Указана скорость транспорта Na^+ (три иона на каждую гидролизованную молекулу АТФ).

липидных молекул). Столь незначительное число переносимых ионов, не вызывая заметных изменений в концентрации K^+ как по ту, так и по другую сторону мембраны, порождает тем не менее весьма значительный электрический сигнал.

Ключевой характеристикой канала является время, необходимое для достижения нового стационарного состояния после открывания канала. Оно зависит как от емкости, так и от удельного сопротивления мембраны. Если мы примем число открытых каналов равным 50 на 1 мкм^2 , то время ответа составит $0,1 \text{ мс}$.

В табл. 8.3 приведены значения числа оборотов для нескольких ионных каналов и переносчиков. Обратите внимание, что для ионных каналов и пор характерны очень большие числа оборотов. Напротив, для лактозопермеазы *E. coli* максимальное число оборотов составляет всего лишь $\sim 30 \text{ с}^{-1}$. Если бы рассмотренные выше ионные каналы работали с такой скоростью, то для достижения той же удельной проводимости потребовалось бы увеличить плотность каналов в 10 млн. раз , что физически невозможно.

Для осуществления лактозопермеазой ее физиологических функций, конечно, не требуется столь большого числа оборотов, как для

каналов. Ее роль состоит в транспорте лактозы — углевода, который затем участвует в клеточном метаболизме. Для ионных насосов, использующих для работы энергию гидролиза АТФ или переноса электронов, характерны максимальные числа оборотов 10^2 — 10^3 с⁻¹, что довольно типично для ферментов, но гораздо меньше аналогичных значений для каналов или пор.

Однако не все переносчики работают столь медленно. Анионный переносчик белок полосы 3 из эритроцитарной мембраны играет важную физиологическую роль в усилении быстрого трансмембранного обмена Cl^- на HCO_3^- (см. разд. 8.3.3). Одна из функций эритроцитов заключается в усилении транспорта CO_2 от различных тканей к легким. В венозных капиллярах CO_2 быстро диффундирует через эритроцитарную мембрану. В клетке под действием карбоангидразы CO_2 превращается в H_2CO_3 , затем быстро устанавливается равновесие $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$, и анион бикарбоната переносится через мембрану в плазму крови белком полосы 3. В результате по мере того, как эритроцит проходит по капиллярам, концентрация HCO_3^- в плазме увеличивается, причем этот процесс занимает меньше 1 с. Когда кровь достигает легких, начинается диффузия CO_2 в атмосферу. При этом под действием карбоангидразы в эритроцитах происходит массовое превращение H_2CO_3 в CO_2 и H_2O . Этот процесс в свою очередь является движущей силой для переноса аниона бикарбоната внутрь эритроцита, где он быстро превращается в CO_2 и H_2O .

Транспортная система должна функционировать очень быстро, но в отличие от ионных каналов в аксонах здесь нет нужды в электрогенных реакциях, которые только замедлили бы быстрый массовый транспорт. Но транспорт катиона, например Na^+ , вместе с HCO_3^- был бы нежелателен, поскольку изменение концентрации соли в эритроците привело бы к осмотическому дисбалансу. Эта проблема решается с помощью антипортера, который в обмен на каждый транспортируемый ион HCO_3^- переносит в обратном направлении анион Cl^- . Такая челночная система работает очень быстро, с числом оборотов 10^5 с⁻¹, что немногим меньше скорости переноса ионов настоящим каналом.

Дополнение 8.1. Время электрического ответа мембраны

Время электрического ответа τ является мерой того, как быстро трансмембранный потенциал достигает нового равновесного значения после открывания специфических ионных каналов. В возбудимых мембранах (таких, как мембраны нервных и мышечных клеток) этот параметр является ключевым и определяется емкостью

мембраны C и удельным сопротивлением R . Получим выражение для τ .

Начнем с того, что продифференцируем по времени уравнение для емкости [уравнение (7.15)]:

$$C \left(\frac{dV}{dt} \right) = \left(\frac{dQ}{dt} \right). \quad (8.1)$$

dQ/dt равно току I и равно нулю, когда напряжение достигает своего конечного значения V_K ($= 100$ мВ). Ток через ионный канал пропорционален разности между истинным напряжением и напряжением, определяемым из уравнения Нернста для равновесного состояния при нулевом потоке [633]. В соответствии с законом Ома $I = (V_K - V)/R$. Отсюда

$$\frac{dV}{dt} = \frac{(V_K - V)}{RC}. \quad (8.2)$$

Решение уравнения имеет вид

$$V = V_K(1 - e^{t/RC}), \quad (8.3)$$

или

$$V = V_K(1 - e^{t/\tau}), \quad (8.4)$$

где $\tau = RC$.

Напряжение на мембране растет экспоненциально от нуля до конечного значения 100 мВ с постоянной времени τ , равной RC . Следовательно, произведение удельного сопротивления мембраны R на емкость C имеет размерность времени и характеризует время электрического ответа мембраны. Предположим, что в мембране открыто 50 каналов на 1 мкм². Это значит, что удельная проводимость мембраны составляет 10 мСм/см² (сила тока на 1 В на 1 см²) и удельное сопротивление мембраны соответственно равно 100 Ом·см². В этом случае $RC = 0,1$ мс, что находится в интервале значений, характерных для возбудимых мембран (от 10 мкс до 1 с) [633]. τ зависит главным образом от удельного сопротивления мембраны, поскольку емкость определяется в основном липидным биослоем (см. гл. 7).

Обратите внимание, что удельное сопротивление мембраны зависит от числа каналов, времени, в течение которого они открыты, и проводимости каждого канала в открытом состоянии. С разработкой методов, позволяющих реконструировать работу одиночных каналов (например, метода пэтч-кламп), появилась возможность прямо измерить эти параметры (разд. 8.1.4).

8.1.2. КАНАЛЫ И ПЕРЕНОСЧИКИ КАК ФЕРМЕНТЫ: ПРИМЕНЕНИЕ ТЕОРИИ СКОРОСТЕЙ

Кинетическую теорию переходного состояния Эйринга, используемую энзимологами, успешно применяют и в случае различных транспортных систем [824, 825, 632, 791]. В основе этого подхода лежит предположение о том, что система может находиться в нескольких дискретных состояниях, каждому из которых соответствует стандартное значение электрохимического потенциала. При этом взаимные переходы между двумя состояниями сопряжены с переходом системы через промежуточные стадии с более высокой свобод-

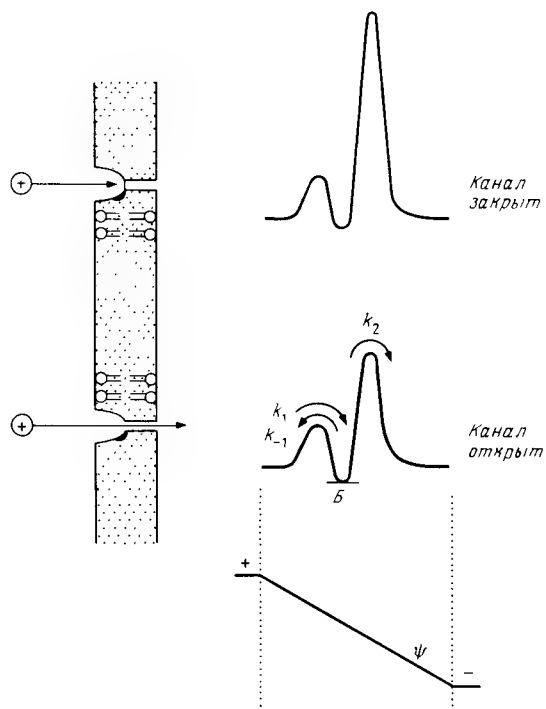
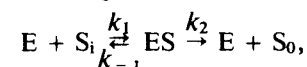


Рис. 8.1. Схема простого ионного канала (слева) с широкими «воротами», ведущими в более узкий канал, через который и проходит ион. Профили свободной энергии (справа) соответствуют случаю, когда в канале имеется единственное место связывания, локализованное где-то вблизи от входа в канал. Глубина впадины (точка Б) отвечает слабому связыванию. При наличии трансмембранной разности потенциалов на профиль свободной энергии налагается профиль электрического потенциала ($\Delta\psi$). В этом случае высота энергетических барьеров, соответствующих k_1 и k_2 , будет меньше и скорость транспорта катионов через канал увеличится.

ной энергией, и константы скоростей переходов зависят от высоты соответствующих энергетических барьеров. Минимумы на кривых изменения свободной энергии (рис. 8.1) соответствуют местам связывания транспортируемых веществ. Можно предположить, что канал или переносчик имеет одно или несколько мест связывания переносимых веществ. При достаточно высоких концентрациях переносимого вещества все эти места оказываются занятыми и скорость переноса достигает своего максимального значения $V_{\max}$, равного максимальной скорости работы фермента. Экспериментальные подтверждения этому получены для всех переносчиков и для многих каналов.

Применение теории переходного состояния при изучении работы каналов

Применим теорию переходного состояния для анализа работы ионного канала в случае, когда ионы изначально присутствуют только с одной стороны мембраны. Примем, для простоты, что внутри канала имеется единственное место связывания и что ионы не могут свободно проникать внутрь канала или покидать его. Если внутри канала имеется много мест связывания, по которым ион может последовательно передаваться, то скорость переноса (поток ионов) будет по-прежнему описываться уравнением Михаэлиса—Ментен. Если принять, что трансмембранное напряжение равно нулю, то «реакцию» можно представить следующим образом:



где E — это каналный белок (или фермент) в «открытом» состоянии, S_i и S_o — транспортируемое вещество (субстрат) внутри и снаружи, ES — комплекс субстрата с местом связывания внутри канала. На рис. 8.1 показан профиль свободной энергии для такой модели. Приведен также профиль для канала в закрытом состоянии. Прохождению иона через канал препятствует увеличение высоты одного из энергетических барьеров, но каков механизм этого процесса, пока неизвестно, за исключением, возможно, канала щелевого контакта [1482]. Закрывание канала может быть обусловлено, например, изменением положения α -спирали или только боковой цепи, в результате чего эффективно блокируется транспорт ионов через канал.

Применение критерия стационарного состояния дает уже знакомое уравнение Михаэлиса—Ментен для скорости (число транспортируемых ионов в 1 с):

$$V = \frac{[E]_0 [S] k_2}{K_M + [S]}, \quad (8.5)$$

где $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, $[E]_0$ — суммарная концентрация переносчика.

Рассмотрим два случая: 1) насыщающая концентрация субстрата, $[S] \gg K_M$; 2) низкая концентрация субстрата, $[S] \ll K_M$.

1. *Насыщающая концентрация субстрата.* В этих условиях все места связывания заняты ($[E]_0 \approx [ES]$) и скорость переноса достигает своего максимального значения, определяемого высотой энергетического барьера для выхода из канала. Это легко увидеть, преобразовав уравнение Михаэлиса — Ментен (8.5) для случая $[S] \gg K_M$:

$$V = V_{\max} = k_2 [E]_0. \quad (8.6)$$

2. *Низкая концентрация субстрата.* При $[S] \ll K_M$ наблюдается линейная зависимость скорости от концентрации субстрата, т. е. имеет место кинетика второго порядка. Кажущуюся константу скорости второго порядка можно получить, преобразовав уравнение Михаэлиса — Ментен для случая малых $[S]$:

$$V = \left(\frac{k_2}{K_M} \right) [E]_0 [S] = \frac{V_{\max}}{K_M} [S]. \quad (8.7)$$

Полученное уравнение достаточно важно, поскольку оно описывает работу большинства, если не всех ионных каналов. Кажущаяся константа скорости второго порядка для этой реакции равна k_2/K_M . Даже для столь простого случая это не истинная микроскопическая константа скорости, а комбинация констант скоростей.

$$\text{Константа скорости транспорта} = \frac{k_2}{K_M} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}. \quad (8.8)$$

Из этой простой модели следует несколько выводов.

1. Измеряемая константа скорости, которая определяет скорость транспорта по открытому ионному каналу, содержит информацию о кажущемся сродстве иона к месту связывания (K_M) и о числе оборотов (k_2). В отсутствие напряжения на мембране эта константа скорости прямо связана с проницаемостью, обусловленной единичным каналом. Если внутренний барьер мал ($k_2 \gg k_{-1}$), то константа скорости транспорта будет равна k_1 — константе скорости второго порядка для иона, входящего в канал. Лимитирующим фактором для этой реакции может служить диффузия, при этом k_1 будет составлять 10^8 – $10^9 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Если внутренний энергетический барьер велик ($k_2 \ll k_{-1}$), то константа скорости транспорта будет равна произведению $(k_1/k_{-1}) \cdot k_2$.

2. Зависимость скорости транспорта (т. е. ионного потока) от

напряжения определяется проводимостью. Это легко понять, если посмотреть, как падение напряжения на мембране влияет на индивидуальные микроскопические константы (k_1 , k_{-1} и k_2 в этой модели). Если на профиль потенциала, изображенный на рис. 8.1, наложить прямую, отвечающую линейному падению напряжения на мембране, то высота энергетических барьеров, отвечающих k_2 и k_1 , уменьшится, а k_{-1} — увеличится. В результате этого существенно увеличится константа скорости второго порядка для ионного транспорта, что и следовало ожидать. Простые модели типа рассмотренной нами не предсказывают линейной (т. е. омической) зависимости тока от напряжения, наблюдаемой экспериментально. Однако при введении в такие модели дополнительных энергетических барьеров кривая зависимости потока от напряжения становится очень близкой к линейной [633, 846].

3. Ионную селективность можно объяснить несколькими путями. Селективность — это способность канала пропускать некоторые ионы лучше, чем другие; ее можно количественно охарактеризовать как отношение проницаемостей или проводимостей для сравниваемых ионов. Поскольку в выражение для константы скорости транспорта (8.8) входят как k_1 , так и k_2 , то причиной селективной ионной проводимости может служить как более низкий энергетический барьер на входе в канал (k_1), так и более низкий барьер для перемещения внутри канала (k_2) для определенного типа ионов. Например, если у входа в канал имеются отрицательные заряды или диполи, то скорость транспорта анионов может уменьшиться, т. е. канал окажется катионселективным. Такая картина наблюдается для нескольких рецепторных канальных белков [713] и грамицидина А [1411]. Размеры переносимых веществ также влияют на скорость транспорта. Если размер молекулы переносимого вещества больше, чем диаметр канала, то это вещество не сможет попасть в канал (эффект молекулярного сита). И наконец, селективность может быть связана с различием в скоростях переноса разных ионов внутри канала. Например, в случае Na^+ -селективного канала энергетический барьер для переноса этого иона внутри канала существенно ниже, чем для других ионов, таких, как K^+ , что ведет к увеличению проводимости по Na^+ . Объяснение молекулярных механизмов этого эффекта обсуждается в разд. 8.2.5. Представляется маловероятным, чтобы причиной ионной селективности было увеличение сродства иона к каналу. Такое изменение, соответствующее увеличению глубины впадины на профиле потенциала (на рис. 8.1 соответствующая точка отмечена буквой Б), должно было бы приводить к уменьшению скорости выхода иона из канала, т. е. к уменьшению максимального потока через канал, а также к уменьшению концентрации иона, необходимой для насыщения канала, т. е. к уменьшению K_M . Около значения K_M для тех каналов,

которые преимущественно пропускают Na^+ или K^+ , достаточно высоки, 200—300 мМ, что выше обычных физиологических концентраций этих ионов.

Применение теории переходного состояния при изучении работы переносчиков [825, 632, 1386, 1286]

Обратимся теперь к переносчикам. Рассмотрим простой переносчик с одним местом связывания, транспортирующий молекулы через мембрану. Рис. 8.2 иллюстрирует основные свойства как первичного активного переносчика, так и пермеазы. Рассмотрим четыре состояния белка-переносчика: 1) белок обращен внутрь/связан с субстратом; 2) обращен внутрь/не связан; 3) обращен наружу/связан с субстратом; 4) обращен наружу/не связан. Тогда транспорт можно представить в виде следующей последовательности элементарных обратимых стадий.

1. Субстрат связывается с участком, обращенным к одной стороне мембраны (определяемой как *цис*-сторона).

2. Происходит конформационное изменение, существенно уменьшающее кинетический барьер для перемещения иона к выходу из канала и увеличивающее энергетический барьер для движения в обратном направлении. Это конформационное изменение может быть спонтанным или может происходить с потреблением энергии (например, энергии гидролиза АТФ). Участок переносчика со связанным субстратом оказывается теперь обращенным к противоположной стороне мембраны (определяемой как *транс*-сторона).

3. Субстрат высвобождается из комплекса с переносчиком и выходит на противоположной стороне мембраны. Для активных переносчиков сродство субстрата к белку ниже, когда место связывания обращено к *транс*-стороне мембраны.

4. Происходит конформационное изменение, возвращающее белок-переносчик к исходной конформации, в которой место связывания вновь обращено к *цис*-стороне.

Ключевым моментом в работе всех переносчиков является наличие высокого энергетического барьера, для преодоления которого соответствующие белки должны претерпеть конформационные изменения. Если для этого необходима энергия, то система может работать как активный переносчик (пример — Ca^{2+} -насос, транспортирующий ионы Ca^{2+} за счет энергии гидролиза АТФ [825]). Если для конформационного перехода необходимо, чтобы молекула переносимого вещества была связана с белком, т. е. стадия 4 отсутствует, то белок будет катализировать только обмен вещества через бислой, поскольку он не может изомеризоваться в «незагруженной» форме (пример — белок полосы 3 эритроцитов [791, 467]).

Для описания работы ионных каналов [633] и различных видов

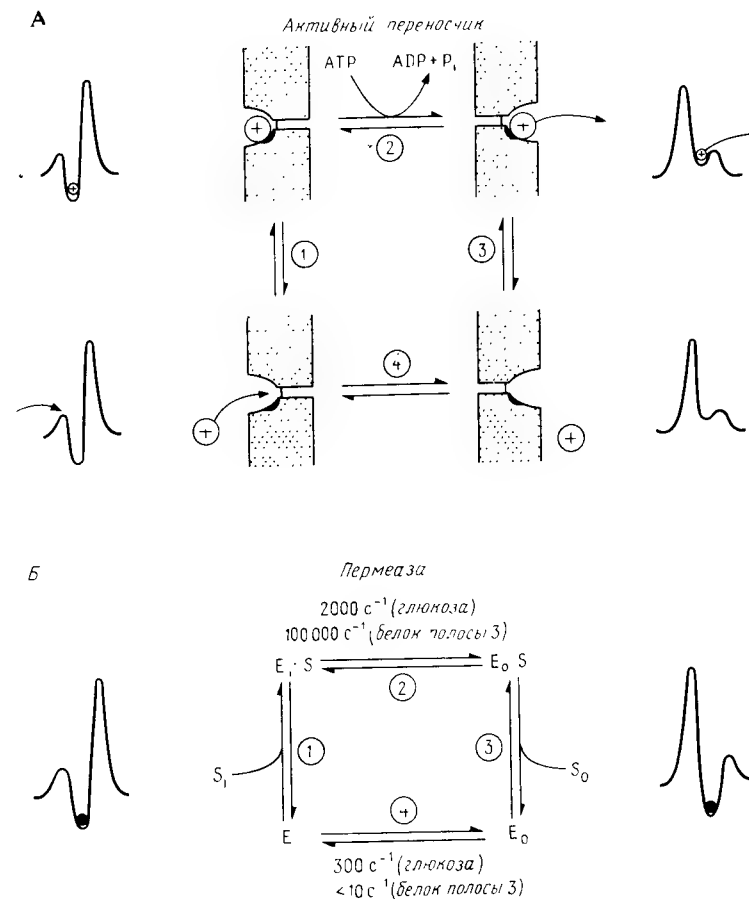


Рис. 8.2. Простые модели четырех состояний для АТФ-зависимого активного переносчика (А) и пермеазы, катализирующей транспорт или обмен веществ (Б). В модели А гидролиз АТФ сопряжен с конформационным превращением, в результате которого изменяются как доступность места связывания, так и сродство к субстрату. В модели Б пермеаза спонтанно переходит из состояния, при котором место связывания обращено внутрь клетки, в состояние с местом связывания, обращенным наружу, причем этот переход не влияет на сродство переносчика к связываемому субстрату. Приведены значения скоростей взаимопревращений для переносчика глюкозы из эритроцитарной мембраны (23 °С) и белка, осуществляющего обмен анионов (белок полосы 3 эритроцитов) (37 °С). Обратите внимание, что в обоих случаях субстрат увеличивает скорость конформационного перехода. Реакция 4 для белка полосы 3 протекает очень медленно, поэтому данный белок катализирует только обмен анионов.

переносчиков [825, 1286] разработано много моделей и схем. Хотя кинетическая теория переходного состояния имеет определенные ограничения, особенно в том, что касается кинетических свойств каналов [846], ее применение упрощает решение многих сложных задач и позволяет единым образом подходить к рассмотрению различных транспортных механизмов.

8.1.3. АНАЛИЗ СТАЦИОНАРНОГО СОСТОЯНИЯ [791, 1386, 41]

Для кинетической характеристики транспортных систем, которые катализируют облегченную диффузию или активный транспорт, могут использоваться различные подходы к анализу стационарного состояния. Все эти подходы основаны на измерении скорости переноса растворимых веществ через мембрану, но при разных условиях. В качестве примера мы рассмотрим эксперименты, которые проводились на пермеазах и мембранных везикулах. Обычно для такого рода измерений используют радиоактивные метки. Ключевым моментом является то, что пермеаза должна не только переносить вещество через бислой (*цис* → *транс*), то также и возвращаться обратно (*транс* → *цис*). Скорость транспорта может зависеть от любой из этих стадий. Опишем вкратце некоторые подходы к анализу.

1. *Субстрат присутствует только с одной стороны мембраны (цис)*. Начальная скорость транспорта измеряется для однонаправленного потока транспортируемого вещества переносчик (пермеаза) должен вернуться свободным. Измеряют поток как функцию $[S]_{\text{цис}}$ для процесса, протекающего в любом направлении (например, для переноса вещества внутрь везикул или для выведения его из везикул).

2. *Равновесный обмен*. Субстрат присутствует в одинаковой концентрации с обеих сторон мембраны, но радиоактивная метка — только с одной стороны (*цис*). В этом случае пермеаза может возвращаться, будучи связанной с немеченым веществом. Измеряют поток как функцию $[S]$.

3. *Меченый субстрат находится с цис-стороны мембраны*, а в насыщающей концентрации он присутствует на противоположной (*транс*) стороне. Измеряют поток как функцию $[S]_{\text{цис}}$. Как и в первом случае, при этом регистрируют однонаправленный поток (*цис* → *транс*). Такой поток называют также *встречным*, поскольку меченое вещество переносится против своего химического градиента.

4. *Удельная радиоактивность субстрата с обеих сторон мембраны одинакова*. В насыщающей концентрации субстрат находится на *транс*-стороне, а $[S]_{\text{цис}}$ изменяется. В этом случае измеряют

суммарный перенос, поскольку радиоактивное вещество пересекает мембрану в обоих направлениях. При таких условиях измерения состояние системы близко к равновесному.

Во всех случаях определяют V_{max} и K_m , которые при этом не обязательно совпадают для разных подходов. Для разных моделей можно получить кинетические уравнения для стационарного состояния и проверить их [791]. Как и в классических работах по энзимологии, очень полезным может оказаться использование ингибиторов [791, 410, 409]. При этом ингибиторы можно вводить с любой стороны мембраны, что позволяет получить дополнительную информацию.

Такого рода подходы можно применять при работе с клетками, субклеточными мембранными везикулами или искусственными реконструированными системами. Для исследования работы ионных каналов обычно применяют электрические методы, которые дают огромные преимущества. Их мы рассмотрим в следующем разделе.

Дополнение 8.2. Исследование транспорта в стационарном состоянии с использованием мутантной лактозопермеазы из *E. coli*

Как пример использования описанных выше подходов рассмотрим изучение транспорта в стационарном состоянии, осуществляемого одной из мутантных форм лактозопермеазы, в которой остаток Glu в положении 325 заменен на Ala ([717]; разд. 8.3.2). На рис. 8.11 этот остаток находится в спирали 10. При измерениях использовали радиоактивную лактозу, при этом накопление лактозы изучали на интактных клетках, а выведение, встречный поток и обмен лактозы — на цитоплазматических мембранных везикулах с правильной ориентацией. Пермеаза дикого типа катализирует импорт β -галактозидов (например, лактозы) и H^+ . В присутствии протонного электрохимического градиента пермеаза использует свободную энергию, высвобождающуюся при переносе H^+ по градиенту, для накопления β -галактозидов против концентрационного градиента.

При замене остатка Glu-325 на Ala активный транспорт лактозы прекращается. Для измерения накопления лактозы использовали интактные клетки, в которых пермеаза дикого типа была заменена мутантной пермеазой. Для этого к суспензии дышащих клеток добавляли $[1-^{14}C]$ -лактозу и измеряли количество лактозы, накапливаемой клетками, в зависимости от времени. Приблизительно через 3 мин перенос лактозы достигал максимальной величины (50—100 нмоль лактозы на 1 мг белка), но в клетках с мутантной перме-

азой оставался пренебрежимо малым. Для изучения выведения лактозы инкубировали мембранные пузырьки в течение нескольких часов в присутствии высоких концентраций радиоактивной лактозы, а затем аликвоты переносили в среду без лактозы. Быстро фильтровали везикулы, измеряли их радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика и определяли скорость потери лактозы везикулами. Время полувыведения для контрольных везикул составляло 10 с, а для пузырьков, содержавших мутантную пермеазу, оно было равно 540 с. Мутантная пермеаза неспособна транспортировать лактозу как в прямом, так и в обратном направлениях.

Совершенно другие результаты были получены, однако, при измерении равновесного обмена. Эти измерения проводят точно так же, как и измерения по выведению лактозы, только нагруженные лактозой везикулы помещают в среду, содержащую немеченую лактозу в такой же концентрации. В этих опытах скорости выведения $[1-^{14}\text{C}]$ -лактозы из везикул, содержавших в одном случае пермеазу дикого типа, в другом — мутантную, были идентичными. Эти эксперименты показывают, что, хотя мутантная пермеаза не может осуществлять полный цикл транспорта лактозы, она способна изомеризоваться в нагруженную форму (связанную с лактозой и H^+), что делает возможным трансмембранный обмен лактозы (см. рис. 8.11). Сходным образом мутантная пермеаза нормально функционирует в опытах по измерению встречного потока. При таком подходе везикулы нагружают немеченой лактозой (10 мМ), разводят средой, содержащей $[1-^{14}\text{C}]$ -лактозу в низкой концентрации (1,6 мМ), и измеряют поток меченой лактозы внутрь везикул. Этот подход также показал, что связанная с лактозой форма пермеазы нормально изомеризуется и осуществляет трансмембранный обмен лактозы.

Приведенные выше данные позволили сделать вывод о том, что мутантная пермеаза, содержащая Ala-325, не может депротонироваться. Таким образом, пермеаза оказывается дефектной по всем сопряженным транспортным процессам, в которых H^+ и лактоза переносятся вместе в цикле, требующем наличия депротонированной формы переносчика для изомеризации ($\text{E}_i \leftrightarrow \text{E}_0$ на рис. 8.11).

Другие примеры использования такого рода подходов более подробно рассмотрены в отличной книге Штейна [1386].

8.1.4. РЕГИСТРАЦИЯ ТОКА, ПРОТЕКАЮЩЕГО ЧЕРЕЗ ОДИНОЧНЫЙ КАНАЛ: ВСТРАИВАНИЕ В ПЛОСКИЕ МЕМБРАНЫ [582, 1010] И МЕТОД ПЭТЧ-КЛАМП [243]

Электрический ток, возникающий при быстром перемещении ионов через канал, можно легко измерить. Например, реконструиро-

ванный никотиновый ацетилхолиновый рецептор — химический воротный катионселективный канал в постсинаптических мембранах, открывание и закрывание которого регулируется с помощью химических веществ, — имеет проводимость в открытом состоянии 45 пСм при концентрации NaCl с одной стороны мембраны 0,5 М. Это — обычное значение проводимости для ионных каналов. При этом при напряжении на мембране 100 мВ через каждый канал проходит ток 4,5 пА, или $2,7 \cdot 10^7$ ионов/с. Этот ток легко зарегистрировать с помощью соответствующей электронной аппаратуры. Следовательно, ток через единичный канал можно прямо измерить, если фоновый ток через мембрану достаточно мал. Для того чтобы исследовать свойства индивидуальных канальных молекул, необходимо измерить ток через участок мембраны в условиях, когда одновременно открыто не более одного канала. Для этого можно использовать искусственную систему, когда в плоскую мембрану встроены одиночные канальные белки [1012, 246, 582]. Можно также воспользоваться методом пэтч-кламп [243]. В основе метода лежит сделанное в 1979 г. открытие, показавшее, что если чистую стеклянную микропипетку прижать к клеточной мембране и слегка втянуть воздух в пипетку, то на ее конце образуется очень тонкая, но прочная мембранная пленка. Это позволяет получать вольт-амперные характеристики любых каналов, находящихся на этом небольшом участке мембраны. Фоновый ток обычно бывает значительно меньше 1 пА, так что ток через индивидуальный канал можно легко измерить. Применение этой техники произвело настоящую революцию в изучении ионных каналов, позволив детально исследовать работу разнообразных каналов из различных мембран. На рис. 8.3 схематически показаны четыре модификации метода пэтч-кламп. В рамках данного метода можно изменять состав раствора как с одной, так и с обеих сторон мембраны, можно измерять проводимость единичных каналов, изучать энзимологию единичных молекул. Все это делает метод пэтч-кламп необычайно мощным.

Чтобы оценить возможности данного подхода, рассмотрим запись работы единичного ацетилхолинового рецепторного канала (рис. 8.4), встроеного в бислой [1012] (см. рис. 2.26). Ворота индивидуальных каналов могут спонтанно открываться и закрываться. Каждое отклонение записи вниз соответствует открыванию канала. Ток, текущий через открытый канал, можно измерить, а это дает возможность определить проводимость единичного канала (ток/напряжение). Время, в течение которого каждый канал остается открытым, также легко измерить. Получаемое при этом распределение времени жизни канала в открытом состоянии прямо связано с константой скорости закрывания канала. Для самой простой модели, когда имеется одно открытое (О) и одно закрытое (С) состояние,

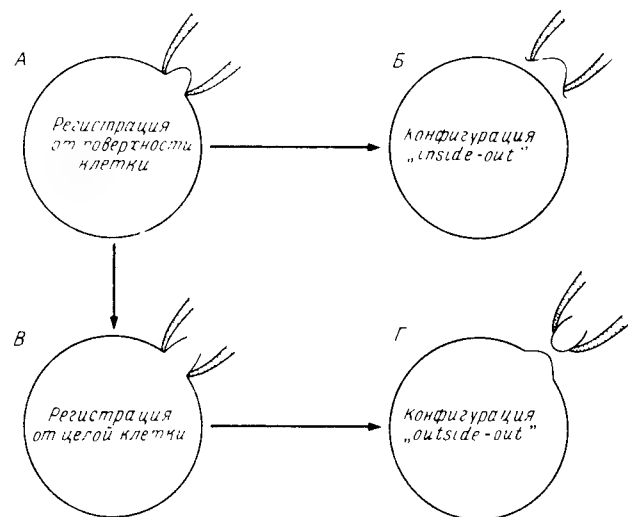


Рис. 8.3. Четыре варианта пэтч-кламп-регистрации [243]. А. Кончик пипетки плотно прижимают к клеточной мембране и проводят регистрацию от интактной клетки. Б. При отведении пипетки кусочек мембраны отрывается от клетки и оказывается прочно связанным с кончиком пипетки. Сторона мембраны, ранее обращенная к цитоплазме, теперь обращена во внешнюю среду (конфигурация "inside-out"). В. При слабом втягивании воздуха в пипетку целостность мембраны под кончиком пипетки нарушается и создается конфигурация, позволяющая проводить измерения на целой клетке. Г. При медленном отведении пипетки от клетки на кончике пипетки остается участок мембраны правильной ориентации ("outside-out").

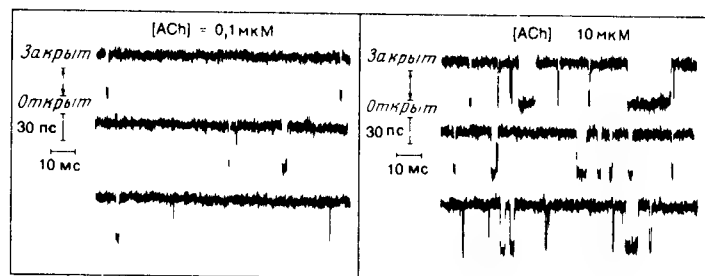


Рис. 8.4. Запись электрического тока через единственный канал ацетилхолинового рецептора, активированный ацетилхолином (ACh, 0,1 или 10 мкМ) при напряжении 100 мВ [805]. Канал был встроен в плоскую мембрану на конце пипетки (см. рис. 2.26). Раствор по обе стороны мембраны содержал 0,5 М NaCl. Приводится с разрешения Society for Neuroscience. Любезно предоставлено д-ром М. Montal.

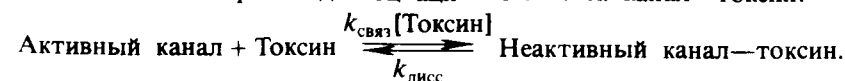
$$O \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C,$$

распределение времени жизни канала описывается экспоненциальной функцией с характерным временем τ , равным величине, обратной константе скорости первого порядка для закрывания канала ($\tau_1 = 1/k_{-1}$). Когда функция распределения времени жизни канала в открытом состоянии отличается от простой экспоненциальной зависимости, как в случае ацетилхолинового рецептора [1012], для объяснения экспериментальных данных необходимо использовать более сложные состояния. Можно изучать влияние на работу канала различных химических агентов; при этом необходимо отличать влияние этих агентов на кинетические параметры открывания-закрывания каналов от их влияния на проводимость одиночных каналов.

Дополнение 8.3. Определение константы связывания ингибитора по данным о проводимости единичного канала

Рассмотрим использование данных о проводимости единичного канала на примере исследования взаимодействия харибдотоксина с Ca^{2+} -активируемым K^{+} -специфичным каналом [1358]. Харибдотоксин, небольшой пептид, выделенный из скорпионов, является эффективным ингибитором этого канала. Биохимические характеристики канала не изучены, однако его работу интенсивно исследовали, используя технику регистрации тока через одиночные каналы. Для этого вначале готовили мембранные везикулы из поперечных волокон скелетных мышц крысы и проводили их слияние с плоским липидным бислоем (гл. 2). На рис. 8.5 приведены записи электрического тока через единственный канал, быстро переходящий из открытого состояния в закрытое. Если эти данные представить в миллисекундном масштабе, то можно будет увидеть отдельные акты срабатывания канала, как это показано на рис. 8.4.

При добавлении харибдотоксина в работе канала появляются длительные периоды, в течение которых он остается в непроводящем состоянии. Очевидно, связывание токсина каким-то образом блокирует канал. Частота появления этих «мертвых» периодов позволяет определить скорость связывания харибдотоксина с каналом; время, в течение которого каналы остаются закрытыми, зависит от константы скорости диссоциации комплекса канал—токсин.



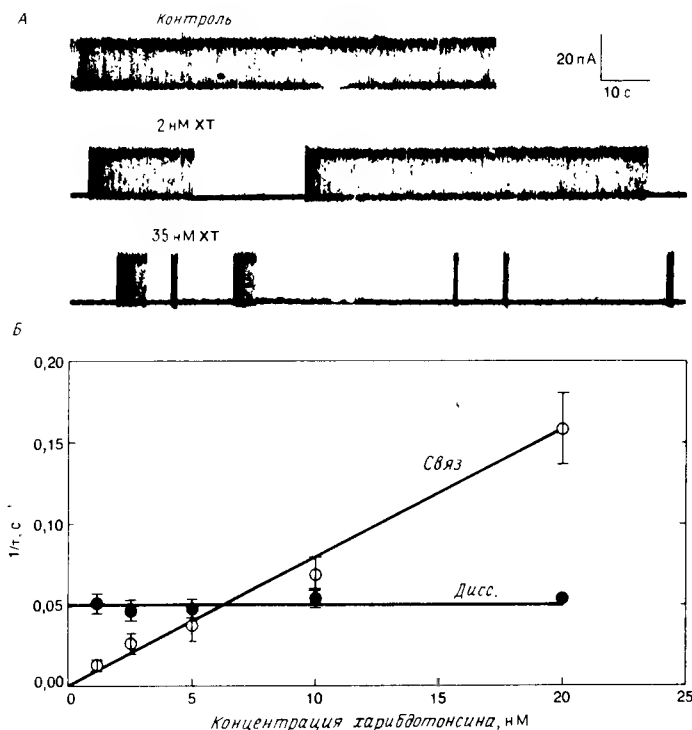


Рис. 8.5. Влияние тетродотоксина на Ca^{2+} -активируемые K^{+} -каналы из мембран скелетных мышц крысы. *А.* Запись тока через одиночный канал. При таком временном масштабе акты открывания/закрывания канала не выявляются, как это было на рис. 8.4. Добавление тетродотоксина (ХТ) приводит к длительной инактивации канала. *Б.* Зависимость величин, обратных времени жизни канала в активном или неактивном состояниях, от концентрации токсина. Рисунок любезно предоставлен С. Miller.

Среднее время жизни канала в активном состоянии τ_1 обратно пропорционально скорости связывания токсина, а время жизни его в закрытом состоянии τ_{-1} — скорости диссоциации:

$$(1/\tau_1) = k_{\text{связ}}[\text{Токсин}],$$

$$(1/\tau_{-1}) = k_{\text{дисс}}.$$

Данные, представленные на рис. 8.5, показывают, что скорость блокирования канала зависит от концентрации токсина, а скорость диссоциации не зависит от концентрации свободного токсина.

Из этих данных легко получить как $k_{\text{дисс}}$, так и $k_{\text{связ}}$ для токсина; их отношение дает константу диссоциации ($K_d = 3,5$ нМ). Замечательно, что получаемые параметры — как кинетические, так и

термодинамические — относятся к событиям, происходящим с индивидуальной молекулой.

8.1.5. НЕБОЛЬШИЕ МОЛЕКУЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛЕЙ КАНАЛОВ И ПОР

Кинетические методы, кратко описанные в предыдущем разделе, используются для анализа работы различных каналов и переносчиков, обнаруживаемых в биомембранах. Расшифрована аминокислотная последовательность многих из этих белков. Однако, как уже отмечалось в гл. 3, до сих пор не удалось провести рентгеноструктурные исследования с высоким разрешением ни для одного из этих транспортных белков, поэтому при изучении структуры и механизмов работы каналов приходится прибегать к модельным построениям. Большие возможности дает использование малых молекул, способных образовывать поры в бислое. Особенно интересны в этом отношении три соединения: 1) нистатин — полиеновый антибиотик, который образует комплекс с холестерином; 2) грамицидин А — пептид, который образует катионселективный канал, наиболее полно охарактеризованный из всех изученных к настоящему времени каналов; 3) аламетицин — пептид, который образует регулируемый напряжением воротный канал. Строение последних двух каналов было описано в разд. 3.7.1.

Нистатин и амфотерицин В [762, 118] (см. разд. 7.1.2)

Структурные формулы этих сходных полиенов приведены на рис. 8.6. Когда к содержащим стерол плоским мембранам с одной стороны от них добавляют нистатин, происходит увеличение мембранной проницаемости для воды, одновалентных ионов и небольших незлектролитов. Незлектролиты, большие, чем глюкоза, пройти через канал не могут. Это говорит о том, что диаметр поры составляет около 8 Å. На рис. 8.6 представлена модель канала, согласно которой от 8 до 10 молекул полиена образуют цилиндрическую структуру, в которой гидроксированные сегменты каждой молекулы обращены внутрь, образуя заполненную водой пору. Наружная поверхность такой структуры неполярна, при этом между каждой парой молекул нистатина имеется пространство для молекулы стерола. Проводимость канала относительно низка, 5 пСм в 2 М KCl. Когда нистатин добавляют к плоской мембране с обеих сторон, две такие цилиндрические структуры, по-видимому, объединяются, образуя в два раза более длинный канал.

Необходимо отметить, что эта порообразующая молекула является амфифильной, поскольку обладает полярным и неполярным

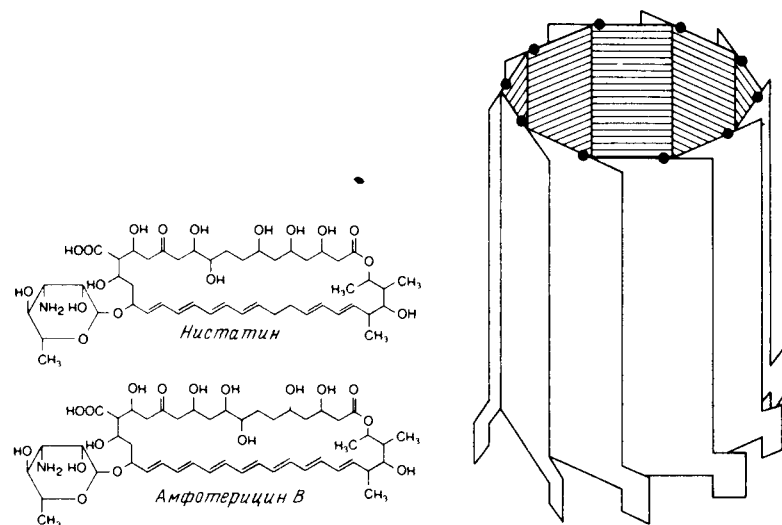


Рис. 8.6. Структурные формулы нистатина и амфотерицина В и канал, образуемый в мембране этими полиеновыми антибиотиками [762, 959а]. Выступы вишу канала — аминсахара, а затененные поверхности внутри канала — гидрофильные полигидроксильные участки молекулы. Наружная поверхность канала абсолютно неполярна.

участками. Полярная часть образуется из последовательно расположенных гидроксильных и карбонильных групп. Порообразующий комплекс, по-видимому, стабилен внутри бислоя. Обе эти структурные особенности характерны для большинства каналобразующих белков. Отметим, однако, что структура нистатиновой поры является гипотетической, хотя построена она на вполне разумных положениях и согласуется с экспериментальными данными.

Грамицидин А [633, 751, 1411] (разд. 3.7.1)

Канал, образуемый грамицидином А — гидрофобным пептидом из чередующихся L- и D-аминокислот, — охарактеризован к настоящему времени наиболее полно. Исходя из имеющихся экспериментальных данных, была построена модель канала (рис. 3.12). Согласно модели, канал образован двумя молекулами грамицидина А, расположенными голова к голове в β (L, D)-спиральной конфигурации. В результате чередования L- и D-аминокислот образуется спираль, в которой все боковые цепи располагаются снаружи, а карбонильные группы остова — внутри канала. Этот тип спирали не встречается больше ни в каких белках и образуется из-за необычного чередования стереоизомеров аминокислот в грамицидине А. С

этой точки зрения грамицидин А является плохой структурной моделью формируемых белками трансмембранных пор. Однако во многих других отношениях канал, образуемый грамицидином А, имеет много общих черт с другими каналами и порами. Отметим следующие его особенности.

1. Грамицидин А чрезвычайно гидрофобен, он не содержит ни одной полярной аминокислоты.

2. Проводимость единичного канала, образуемого грамицидином, довольно велика. Например, в 100 мМ RbCl катионная проводимость составляет 30 пСм на канал. Впрочем, это гораздо ниже теоретической предельной величины для поры этого размера, если перенос вещества через пору лимитируется только диффузией (300 пС) [633].

3. Грамицидиновый канал является катионселективным. Небольшие неорганические и органические катионы проходят через него, в то же время проницаемость по Cl^- равна нулю. Хотя этот анион достаточно мал, чтобы легко пройти через пору такого диаметра, он не транспортируется через грамицидиновый канал и не блокирует его. Этот факт весьма примечателен, если принять во внимание, что в грамицидине нет полярных или заряженных аминокислот. Такая селективность объясняется электростатическим отталкиванием анионов и диполей, образуемых карбонильными группами в воротах канала [1411].

4. Проницаемость канала для одновалентных катионов изменяется в следующем порядке: $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$; такая же последовательность сохраняется и для свободной диффузии этих ионов в воде. Селективность, проявляемая каналом в отношении данных одновалентных катионов, невелика, она соответствует всего пятикратному изменению коэффициентов проницаемости. Энергия активации проводимости мала, около 5 ккал/моль (такое же значение характерно и для ионов, диффундирующих в воде). В этом смысле канал функционирует так, как будто он заполнен водой. Возможности свободной диффузии катионов в растворе в значительной степени зависят от электростатических взаимодействий с водой. Небольшие ионы (например, Li^+) взаимодействуют с молекулами воды сильнее, чем крупные, и электростатическая поляризация вызывает замедление диффузии. Такого же рода силы, по всей вероятности, влияют и на лимитирующие стадии, когда катионы проходят через длинный узкий грамицидиновый канал.

5. Молекулы могут проходить через канал только поодиночке, поскольку его диаметр составляет всего 4 Å. Следовательно, транспортируемый ион в момент вхождения в канал должен частично дегидратироваться. Помимо переносимого катиона в канале могут находиться от пяти до семи молекул воды, и ион будет контактировать с двумя из них, находящимися спереди и сзади от него. В

канале должны присутствовать также группы, с которыми будет взаимодействовать транспортируемый ион вместо утраченных при дегидратации молекул воды. Дегидратация требует больших затрат энергии [633], поэтому скорее всего именно эта стадия будет лимитирующей.

6. Транспорт ионов через канал, образуемый грамицидином А, характеризуется при достаточно высоких концентрациях соли кинетикой с насыщением. Это указывает на то, что в канале имеется определенное число мест связывания катионов. Например, полунасыщающая концентрация для Na^+ -проводимости составляет 0,31 М. Кинетические модели переноса предполагают наличие двух мест связывания, по одному у каждого входа в канал. Связывание катиона осуществляется в результате его взаимодействия с диполями, в частности с карбонильной группой остатка 11 [1411].

7. Вода проходит через канал со скоростью около 10^8 молекул в 1 с при низкой ионной силе. Перемещение катиона под влиянием электрического поля сопровождается переносом 5—7 молекул воды, находящихся в канале, что создает электроосмотические эффекты.

8. Открывание и закрывание грамицидинового канала происходит соответственно в результате ассоциации мономеров, образующих димер, и диссоциации димера. Время жизни димера составляет порядка 10 мс—10 с и зависит от липидного состава мембраны и других факторов.

9. Когда грамицидин А находится в отрицательно заряженном липидном бислое, под влиянием поверхностных зарядов может произойти увеличение локальной концентрации катиона у входа в грамицидиновую пору. Это значительно увеличит проводимость канала при низких концентрациях соли.

Все сказанное выше ясно показывает, почему грамицидин А является столь важной экспериментальной моделью. Многие из его свойств аналогичны свойствам, проявляемым физиологически важными каналами, такими, как ацетилхолиновый рецептор.

Аламетицин [969, 1223, 397]

Аламетицин — это один из представителей группы природных пептидов, которые образуют потенциалзависимые каналы и потому представляют собой хорошую модель для изучения регуляции работы канала с помощью трансмембранного потенциала. Молекула аламетицина состоит из 20 аминокислот, в частности, она содержит остатки α -аминоизобутирата (см. разд. 3.2.1). Основной структурной особенностью аламетицина и его гомологов является их способность образовывать α -спирали. В отличие от β (L, D)-спирали, образуемой грамицидином А, пространство внутри α -спирали слишком мало, чтобы через него мог пройти ион. Эксперименталь-

ные данные скорее свидетельствуют о том, что до 12 молекул аламетицина агрегируют и образуют пору (см. рис. 3.13). Как отмечалось в гл. 3, когда аламетицин находится в такой конфигурации, полярные атомы оказываются внутри структуры. Отметим, что для обеспечения полярности наполненного водой канала не требуется присутствия боковых групп полярных аминокислот.

При низком напряжении (<100 мВ) плоская мембрана, содержащая аламетицин, не проводит электрический ток. По мере увеличения напряжения до некоего критического значения аламетициновые каналы начинают проводить ток. Напряжение на мембране может быть любого знака. Проводимость единичного канала очень высока: она составляет 5000 пСм в 1 М КСl и свидетельствует о том, что размер пор очень велик. Если предположить, что канал образуется 12 агрегированными мономерами аламетицина, то его диаметр должен быть равен 20 Å, что соответствует высокой проводимости единичного канала.

Для объяснения возможного механизма регуляции работы аламетицинового канала путем изменения напряжения на мембране разработано несколько моделей. Все они предполагают, что диполи в α -спирали, образуемые пептидными группами, суммируются и создают общий диполь, такой, что положительный заряд локализуется на N-конце молекулы, а отрицательный — на C-конце. Трансмембранный потенциал достаточно велик, чтобы при взаимодействии с этим постоянным диполем могло произойти изменение ориентации спирального пептида в мембране [969] или увеличилась эффективность его включения в мембрану [1223].

Рассмотрим простейшую модель, описывающую открывание канала при наложении поля. Согласно этой модели, под действием электрического поля увеличивается число встраиваемых в мембрану молекул аламетицина, в результате чего момеры начинают агрегировать с образованием цилиндрического канала, причем процесс характеризуется высокой степенью кооперативности [1223]. Однако существует и другая точка зрения, согласно которой аламетицин находится в связанной с мембраной непроводящей форме уже в отсутствие напряжения и при наложении электрического поля только агрегирует с образованием канала в открытой конформации. Электрическое поле в рамках этих моделей вызывает дипольный флип-флоп-переход α -спирального пептида, стабилизируя агрегат, в котором α -спирали параллельны друг другу [969].

Аламетицин представляет собой хорошую модель, позволяющую объяснить процесс образования поры при ассоциации α -спиралей; он также дает возможность продемонстрировать на простой системе, как трансмембранный потенциал стабилизирует определенные белковые конформации и тем самым оказывает существенное влияние на проводимость канала. Такими свойствами обладают не

только пептиды типа аламетицина. В качестве примера можно привести синтетические пептиды [723] и мелиттин [1524].

8.2. Несколько примеров пор и каналов [377]

В последнее время достигнуты большие успехи в определении строения пор и каналов на молекулярном уровне. Выявляются некоторые общие структурные элементы этих образований. Анализ аминокислотных последовательностей соответствующих молекул указывает на существование структурно родственных групп ионных каналов (табл. 8.2). Особенно ценным в этих исследованиях оказался метод реконструкции изображения; с его помощью удалось не только визуализировать отверстия в мембране, создаваемые большими порами, но и выявить симметричную организацию субъединиц вокруг центрального отверстия (табл. 8.4). Общим структурным мотивом для этих белков может быть цилиндрический канал, формируемый несколькими амфифильными α -спиралями разных субъединиц или отдельными доменами одной субъединицы [1479]. Впрочем, структура аламетицина и грамицидина А свидетельствует о том, что боковые цепи полярных аминокислот не нужны для формирования полярной внутренней структуры заполненного водой канала. Ни в одном из случаев не доказано достоверно, что кислые остатки непосредственно участвуют в образовании поры. Важным исключением из α -спирального семейства каналов являются порины, поскольку они формируют поры из β -слоев, а не с помощью α -спиралей.

Таблица 8.4. Псевдосимметрия некоторых пор и каналов

Пора/канал	Структурная симметрия	Комментарии
Порины	Симметрия 3-го порядка	Три идентичные субъединицы
Натриевый канал	Симметрия 4-го порядка	Четыре гомологичных домена единственной субъединицы
Канал ацетилхолинового рецептора	Симметрия 5-го порядка	Организация четырех гомологичных субъединиц в виде $\alpha_2\beta\gamma\delta$
Щелевой контакт	Симметрия 6-го порядка	12 идентичных субъединиц, по шесть в каждой мембране
Ядерный поровый комплекс	Симметрия 8-го порядка	Субъединичный состав неизвестен

8.2.1. ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ [871]

Щелевые контакты — это кластеры мембранных каналов, которые соединяют содержимое соседних клеток в тканях. Через такие каналы проходят небольшие молекулы — метаболиты и неорганические ионы. Диаметр каналов в клетках млекопитающих составляет от 12 до 20 Å [871, 1515]. Через них осуществляется перенос из клетки в клетку ионов и химических веществ. Таким образом, эти каналы соединяют две плазматические мембраны. Опыты по клонированию [273] и биохимической реконструкции показали, что канал образован олигомером единственного пептида, мол. масса которого для клеток печени составляет 32 000 [871]. Исходя из данных об аминокислотной последовательности, можно предположить, что в каждой субъединице имеются четыре трансмембранные α -спирали [1631]. К настоящему времени охарактеризованы белки щелевых контактов (или коннектины) из нескольких тканей; по-видимому, они образуют обширную группу родственных белков [871, 916]. Эти каналы обычно находятся в открытом состоянии, но закрываются, когда понижается скорость метаболизма [1515]. Первичным сигналом для закрывания канала является, по всей вероятности, повышение концентрации Ca^{2+} , хотя при изменении трансмембранного потенциала или закислении среды также наблюдается закрывание канала. Возможно, эффект Ca^{2+} является опосредованным. Другим способом регуляции работы канала может быть фосфорилирование [871].

Основная модель, описывающая строение и возможный механизм работы канала, представлена в работе [1482]. Для выяснения структуры канала авторы использовали электронную микроскопию. Каждый канал состоит из 12 субъединиц, по шесть от каждой клетки. Канал представляет собой гексамерную структуру с центральной порой. Каждая субъединица имеет форму стержня, пронизывающего бислой. Два гексамерных комплекса соседних мембран соединены конец к концу и образуют протяженный канал, объединяющий обе мембраны. Структура канала щелевого контакта зависит от наличия ионов Ca^{2+} . В присутствии Ca^{2+} субъединицы расположены параллельно центральной оси канала, а в отсутствие этих ионов они несколько наклонены (открытое состояние). Это наводит на мысль, что открывание и закрывание канала происходит аналогично работе ирисовой диафрагмы фотоаппарата; субъединицы скользят друг относительно друга в ответ на сигнал к открыванию или закрыванию. Однако точный механизм этого процесса далеко не ясен.

8.2.2. ЯДЕРНЫЕ ПОРОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Как упоминалось в гл. 1, ядерная оболочка состоит из двух мембран. Ядерные поровые комплексы участвуют в транспорте веществ между ядром и цитоплазмой [1217]. Эти поры, аналогично каналам щелевых контактов, пронизывают две мембраны. По данным электронной микроскопии высокого разрешения, ядерная пора имеет октагональную симметрию, но устроена сложнее, чем канал щелевого контакта [1483]. Ядерная пора представляет собой два октагональных цилиндра (по одному в каждой мембране), соединенных вместе наподобие канала щелевого контакта. Полипептидный состав поры ядерной оболочки окончательно не установлен [294].

Размер поры ядерной оболочки весьма велик, радиус ее функциональной части составляет $\sim 90 \text{ \AA}$; через нее могут проходить как небольшие растворимые вещества, так и многие крупные молекулы. Существуют специальные механизмы транспорта макромолекул внутрь ядра и из ядра в цитоплазму, однако до сих пор о них мало что известно. Процессы транспорта в ядро белков, синтезированных в цитоплазме, рассматриваются в гл. 10.

8.2.3. ПОРИНЫ [579, 86, 1053]

Порины образуют поры, которые функционируют как молекулярные сита, опосредуя диффузию небольших гидрофильных молекул через наружную мембрану грамотрицательных бактерий. Исследование более чем сорока различных поринов [57] позволило выявить некоторые их общие особенности. Мол. масса поринов варьирует от 28 000 до 48 000. В мембране они обычно присутствуют в виде тримеров. Для поринов характерно высокое (до 60%) содержание β -слоев [1523]. Наиболее полно к настоящему времени охарактеризованы порины из *E. coli*: OmpF (порин матрикса), OmpC, PhoE и LamB (мальтопорин). Структура этих поринов обсуждалась в разд. 3.5.3. Их основной особенностью является то, что они образуют наполненный водой трансмембранный канал, причем этот канал образован в основном β -структурными элементами. На рис. 8.7 представлена одна из возможных моделей образования поринового канала из амфифильных β -цепей. Порины прочно связаны с липополисахаридами и с пептидогликаном, однако эти вещества не являются необходимыми для функционирования поринов как трансмембранных пор.

Образуемые порином каналы сильно различаются как по размерам (диаметр от 6 до 23 $\text{\AA}$), так и по селективности (от трехкратной для анионов до сорокакратной для катионов) [579]. Селективность связана с наличием внутри канала или около входа в канал заряженных аминокислотных остатков [580]. Измерения проводи-

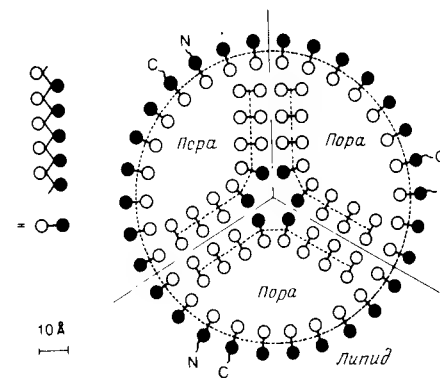


Рис. 8.7. Модель поринового тримера (вид сверху); каждая субъединица содержит пору, внутренняя поверхность которой образована остатками гидрофильных аминокислот [1523]. Каждая «гайтелька» — это β -цепь из чередующихся гидрофильных (светлые кружки) и гидрофобных (темные кружки) остатков. Сплошные линии — границы между отдельными субъединицами.

мости одиночных каналов и проницаемости пор, а также электронно-микроскопические исследования указывают на то, что строение пор не одинаково для разных поринов. В одних случаях тримеры порина образуют один большой канал, в других — три независимых канала (рис. 8.7). Канал OmpF имеет три входа с наружной стороны клетки, которые затем сливаются, образуя единый выход в периплазму [579].

Три из четырех поринов *E. coli* имеют много общих структурных особенностей, а их аминокислотные последовательности в значительной степени гомологичны. Эти порины образуют поры диаметром 10–12 $\text{\AA}$ (OmpF, OmpC и PhoE). Четвертый порин, LamB (мальтопорин), значительно отличается от трех предыдущих, хотя его аминокислотная последовательность обнаруживает некоторое сходство с ними. Он тоже образует главным образом β -складчатые структуры [579]. LamB является частью системы транспорта мальтозы и обладает родством к производным мальтозы. В отсутствие мальтозы LamB образует небольшие каналы, которые целиком блокируются при связывании мальтозы [87]. Главной функцией LamB является стимуляция накопления мальтозы, а не работа в качестве диффузионной поры для небольших растворимых веществ. Топографию LamB исследовали с помощью различных методов (см. гл. 4), включая генетические. В результате была построена детальная модель этого канала, пронизывающего мембрану [127].

Предположение о том, что порины являются воротными каналами и, значит, могут находиться в закрытом состоянии, подверглось всесторонней проверке [813]. In vitro работа поринов (например, OmpF) может регулироваться напряжением на мембране (открытие — закрытие), однако физиологическая значимость этого явления остается неясной [813].

И наконец, следует отметить, что из наружной мембраны митохондрий были выделены порины, работа которых регулируется напряжением на мембране. Они называются потенциалзависимыми анионселективными каналами [451, 884]. Эти порины не являются родственными бактериальным поринам, но они также образуют цилиндрическую пору из β -структурных элементов [451].

В заключение отметим, что порины представляют особый интерес, поскольку они показывают, что трансмембранные каналы могут образовываться не только из α -спиралей, но и из β -слоев. Кроме того, как мы уже говорили в разд. 3.5.3, проводимые в настоящее время кристаллографические исследования позволяют надеяться, что удастся определить структуру пориновых каналов с высоким разрешением.

8.2.4. НИКОТИНОВЫЙ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР (nAChR-КАНАЛ) [1012, 663, 1399, 564]

nAChR-канал является примером канала, работа которого регулируется нейромедиатором. Эти каналы находятся главным образом в концевых пластинках — постсинаптических мембранах нервно-мышечных соединений скелетных мышц. При электрическом возбуждении нейрона из него высвобождается нейромедиатор ацетилхолин. Последний диффундирует от пресинаптической мембраны нейрона к мембране скелетной мышцы. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы имеют вид плотно упакованных кластеров в плазматической мембране мышечного волокна, входящей в состав концевой пластинки. При взаимодействии с ацетилхолином канал открывается, опосредуя селективное перемещение катионов. Под действием ионного тока изменяется трансмембранный потенциал и происходит электрическое возбуждение мышечной клетки, что приводит к сокращению мышцы.

nAChR-канал регулируется с помощью химических механизмов, причем сигнал действует непосредственно на канал. Химическим сигналом является ацетилхолин, который передает возбуждение от нервного волокна к мышце. Анализ аминокислотной последовательности показал, что никотиновый ацетилхолиновый рецептор и два других нейромедиаторных рецептора — глициновый рецептор и рецептор γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) — имеют много общих структурных особенностей [1302, 549]. Они образуют группу

химически регулируемых каналов (табл. 8.2). Впрочем, несмотря на сходство аминокислотных последовательностей, эти белки имеют разную четвертичную структуру. Биохимические свойства рецептора глутамата, одного из важных нейромедиаторов головного мозга, не исследованы [1390].

Отметим, что номенклатура и классификация нейромедиаторных рецепторов основаны главным образом на данных о влиянии на них различных лекарственных веществ, в особенности тех, которые выступают в роли агонистов, стимулируя рецептор наподобие естественного нейромедиатора, или антагонистов, которые блокируют стимулирующий эффект агонистов. Например, рецепторы ацетилхолина в начале этого века разделяли на никотиновые и мускариновые на основании их фармакологических различий. Никотиновые рецепторы ацетилхолина — это группа родственных рецепторных белков. Мускариновый рецептор из клеток мозга структурно не сходен с nAChR-каналом [1336, 793] и в действительности не является каналом; механизм его функционирования будет обсуждаться в следующей главе. Необходимо отметить, что охарактеризованы никотиновые ацетилхолиновые рецепторы из ткани мозга, по некоторым структурным и функциональным особенностям отличающиеся от каналов концевой пластинки [1572]. Однако в этом разделе мы остановимся главным образом на каналах концевых пластинок.

По сравнению с другими канальными белками nAChR-канал охарактеризован наиболее полно, и связано это с тем, что существует легкодоступный источник, содержащий большие количества данного белка. Большая часть биохимических экспериментов была поставлена с использованием рецептора, выделенного из электрического органа скатов *Electrophorus* и *Torpedo*. Показано, что эти каналы очень похожи на каналы концевых пластинок как в структурном, так и в функциональном отношении. Гибридные белки, состоящие из субъединиц рецепторов из электрического органа *Torpedo* и нервно-мышечного соединения быка, оказались полностью функциональными [677].

Выделенный и очищенный nAChR-канал состоит из пяти полипептидных субъединиц четырех разных типов со стехиометрией $\alpha_2\beta\delta\gamma$. Две копии α -субъединиц, присутствующие в комплексе, по всей вероятности, выполняют разные функции [1200]. Субъединицы близки друг к другу по аминокислотной последовательности и различаются по кажущейся молекулярной массе (от 40 000 до 68 000). Все субъединицы фосфорилированы и гликозилированы, а к двум, α и β , ковалентно присоединен липид [1094] (см. гл. 3).

На основе электронно-микроскопических методов реконструкции изображения была построена модель канала, приведенная на рис. 8.8 [663]. Метод негативного контрастирования ясно показыва-

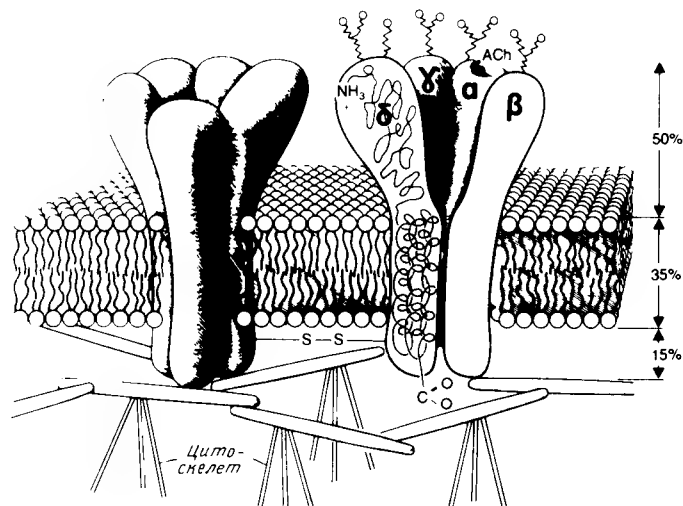


Рис. 8.8. Модель канала никотинового ацетилхолинового рецептора [663]. Показаны общий вид канала и его расположение в мембране, отмечены участки гликозилирования с наружной стороны и места связывания ацетилхолина на α -субъединицах.

ет, что канал имеет центральное отверстие диаметром $30 \text{ \AA}$ с внеклеточного (синаптического) конца и значительно более узкое с цитоплазматической стороны. На фотографиях четко видна пентамерная структура комплекса. Это означает, что пять субъединиц организованы вокруг центральной поры. Использование реагентов, образующих поперечные сшивки (гл. 4), показывает, что субъединицы расположены в следующей последовательности: $\beta-\alpha-\delta-\gamma-\alpha$, так что α -субъединицы не соседствуют друг с другом. По данным многочисленных исследований [663], места связывания ацетилхолина, других агонистов и конкурентных антагонистов располагаются на α -субъединицах. Следовательно, существуют два места связывания для этих химических агентов. Антагонисты препятствуют активации, вызываемой агонистами, или путем прямой конкуренции за связывание с теми же участками (конкурентные антагонисты, например α -бунгаротоксин), или за счет связывания с каким-либо другим местом и, возможно, взаимодействия с каналом *per se* (неконкурентные антагонисты, например TPMP⁺).

Как видно из рис. 8.8, nAChR-канал имеет длину около $140 \text{ \AA}$, причем участок длиной $70 \text{ \AA}$ расположен над поверхностью бислоя с наружной стороны, образуя большие ворота канала. В клетках *Torpedo* канал существует в виде димерных единиц, связанных друг с другом дисульфидным мостиком между δ -субъединицами с вне-

клеточной стороны [356]. Часть канала, выступающая из бислоя с цитоплазматической стороны, гораздо менее протяженна; по-видимому, она взаимодействует с элементами цитоскелета, что способствует образованию плотноупакованных кластеров канальных белков в концевой пластинке. Было высказано предположение, что эти взаимодействия опосредует особый белок мол. массой $43\,000$ [110] (рис. 8.8). В концевой пластинке каналы могут быть собраны в кластеры с плотностью до $10\,000$ молекул на 1 мкм^2 , что близко к теоретическому пределу [633]. При взаимодействии с ацетилхолином или другими агонистами через данный участок мембраны начинается течь электрический ток, деполяризирующий постсинаптическую мембрану.

Кинетическое поведение nAChR-канала можно с успехом анализировать, если рассматривать его как аллостерический фермент, способный находиться в нескольких конформациях [1477]. Существуют как минимум три состояния, в которых может находиться канал: открытое, закрытое и инактивированное. Для индукции перехода канала из закрытого состояния в открытое, в котором он остается около 1 мс , необходимо кооперативное связывание двух молекул ацетилхолина (см. рис. 8.4). В инактивированном состоянии канал остается закрытым даже в присутствии ацетилхолина. Измерения проводимости одиночного канала свидетельствуют о наличии более чем одного открытого состояния [1012], и кинетическая модель при этом оказывается достаточно сложной [1477]. Опыты по встраиванию канала в липидный бислой показали, что липидное окружение может влиять на способность канала к переходу из одной конформации в другую [445].

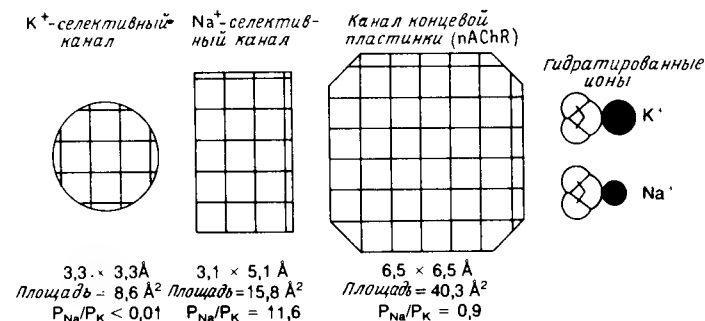


Рис. 8.9. Размеры трех каналов из нервных и мышечных волокон лягушки, полученные с помощью метода «молекулярного сита» [362a]. Длина стороны каждого квадрата равна $1 \text{ \AA}$. Приведены также отношения коэффициентов проницаемости для Na⁺ и K⁺ и относительные размеры этих ионов. В основном растворе отношение коэффициентов диффузии для Na⁺ и K⁺ равно $0,7$.

В открытой конформации канал проницаем для катионов и небольших неэлектролитов, но не анионов. Ограничения, налагаемые на размер проходящих молекул, позволяют судить о размерах наиболее узкой части канала. Соответствующие данные представлены на рис. 8.9 вместе с данными для двух других каналов. Радиус небольшого негидратированного иона, способного проходить через канал, является разумной оценкой предельных размеров канала. Непроницаемость канала для анионов и в три раза большую проницаемость для катионов, чем для незаряженных молекул, можно объяснить электростатическими взаимодействиями, возникающими благодаря присутствию в воротах канала биполярных или отрицательно заряженных групп. Селективность канала по отношению к одно- и двухвалентным катионам невелика, но согласуется с моделью, в которой ионы даже внутри канала взаимодействуют главным образом с молекулами воды, а не с элементами собственно канала [852]. Хотя размеры nAChR-канала относительно велики, он все же слишком мал, чтобы через него могли проходить полностью гидратированные ионы. Внутренняя полость канала должна содержать группы, которые могли бы легко заменить утраченные при дегидратации молекулы воды.

О молекулярной структуре этого канала известно больше, чем о структуре какого-либо иного канала. И все же, к сожалению, не выработано единой точки зрения на то, как построен данный канал, хотя было создано много достаточно детальных моделей [663, 1399, 564]. Большой вклад в исследование этого вопроса внесли работы с использованием методов молекулярной генетики. Так, при помощи клонирования генов каждой из субъединиц nAChR-канала из нескольких источников были определены аминокислотные последовательности этих субъединиц, анализ которых выявил наличие высококонсервативных участков. В качестве потенциальных трансмембранных α -спиралей было идентифицировано до семи различных сегментов [1198]. Наиболее интересен один из них, обозначаемый как M5 или MA; он может образовывать амфифильную спираль с заряженными группами, расположенными с одной стороны (см. разд. 3.6). Большинство исследователей полагают, что узкая часть канала, пронизывающая бислой, построена из субъединиц, каждая из которых образует α -спираль. Ансамбль α -спиралей формирует центральную пору. Первым кандидатом на эту роль является амфифильная спираль, хотя модельные исследования с грамицидином A с очевидностью показали, что наличие заряженных групп не является необходимым условием для образования наполненного водой катионселективного канала. Экспериментальные данные о прямом участии амфифильной спирали в формировании канала отсутствуют; даже вопрос о том, является ли эта спираль трансмембранной, не решен окончательно [1198, 776]. Имеются данные, что

в формировании канала участвует другая спираль, M2 [677, 664, 1022, 1456]. Эти данные были получены при изучении связывания с каналом неконкурентных антагонистов [664, 1022] и с помощью молекулярно-генетических методов [677, 1456]. Хотя спираль M2 не является амфифильной, она может образовывать канал, аналогичный грамицидиновому или аламетициновому. Отметим, что другие члены группы нейромедиаторных рецепторов (табл. 8.2) не имеют участков, аналогичных амфифильной спирали никотинового ацетилхолинового рецептора.

В работах Нума и др. [677, 996, 997, 1456] впервые были продемонстрированы возможности применения сайт-специфического мутагенеза при исследовании подобного рода систем. Гены, кодирующие каждую из четырех субъединиц канала, клонировали в клетках обезьяны и ооцитах *Xenopus* и наблюдали экспрессию функциональных каналов в плазматической мембране. Для изучения работы таких каналов очень ценным оказались методы регистрации токов через одиночные каналы. Есть надежда, что с развитием подобных экспериментальных подходов мы сможем получить ответы на многие давно интересующие нас вопросы о строении каналов. Использование поликлональных и моноклональных антител поможет выявить те участки полипептидов, которые ответственны за связывание ацетилхолина (или токсина) [997, 1060, 71], а также участки, формирующие собственно канал. В настоящее время большинство исследователей полагают, что этот канал образуется из α -спиралей, как аламетициновый канал. Те же представления легли в основу модели Na^+ -канала (см. ниже).

8.2.5. ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫЙ НАТРИЕВЫЙ КАНАЛ [193, 79]

Потенциалзависимый натриевый канал обеспечивает быстрое увеличение натриевой проводимости, ответственное за фазу деполяризации при развитии потенциала действия в нервных и мышечных клетках. Этот канал был очищен до гомогенного состояния из нескольких источников, в частности из мозга крысы, скелетных мышц млекопитающих, сердца цыпленка и электрического органа ската *Electrophorus electricus*.

Очищенные каналы из *Electrophorus electricus* и сердца цыпленка содержат единственную гликопротеиновую субъединицу с мол. массой ~ 260 000, в то время как каналы, выделенные из тканей млекопитающих, содержат еще одну [1277] или две [975] меньшие субъединицы с мол. массой от 33 000 до 38 000 (β 1- и β 2-субъединицы). Большую часть из этих очищенных препаратов каналов удалось встроить в плоские мембраны, при этом они сохраняли присущие им *in vivo* электрофизиологические и фармакологические характеристики. Для успешной реконструкции канала, выделенного из тканей

млекопитающих, необходим по меньшей мере один из небольших ассоциированных белков [975].

Натриевые каналы взаимодействуют с различными токсинами, в частности с тетродотоксином, сакситоксином и α -токсином скорпиона, которые очень прочно связываются с каналными белками и могут использоваться при количественных биохимических измерениях. Присутствие этих токсинов очень важно как для биохимической очистки каналов, так и для изучения их работы *in vivo*. Как и канал концевой пластинки (nAChR), натриевые каналы распределены в плазматической мембране не равномерно, а собраны в кластеры (гл. 4). В мышечных клетках Na^+ -каналы сконцентрированы в районе концевой пластинки вместе с nAChR-каналами [349].

Нума с соавторами клонировали гены, кодирующие белки натриевых каналов из *Electrophorus* [1074] и главную субъединицу канала из мозга крысы [1076, 1075], и определили их нуклеотидную последовательность. Было показано, что белок натриевого канала из *Electrophorus* содержит 1820 аминокислотных остатков, организованных в четыре повторяющиеся гомологичные единицы (рис. 8.10). По мнению разных авторов, каждый гомологичный участок содержит 4, 6 или 8 трансмембранных α -спиралей [1076, 546, 565]. Некоторые из этих предполагаемых трансмембранных спиралей (сегменты S4) амфифильны и аналогичны постулированным для nAChR-канала (см. предыдущий раздел). Имеются экспериментальные данные о том, что карбоксильный конец полипептидной цепи локализован на цитоплазматической поверхности [531]; сообщалось также, что амфифильная S4-спираль является внецитоплазматической [961]. Однако никакой дополнительной информации, позволяющей подтвердить предложенные топологические модели, не существует. Нет также данных о том, какие участки полипептида непосредственно вовлечены в образование поры. Различные модели натриевого канала концептуально близки к моделям канала концевой пластинки в том отношении, что канал *per se* состоит из кластера α -спиралей, образующих центральную пору. В этом случае, однако, вместо пяти различных субъединиц мы имеем четыре гомологичных домена единственной субъединицы. По всей вероятности, специфичные группы организованы в канале таким образом, что образуется «селективный фильтр».

Предельные размеры канала можно оценить, используя метод «молекулярного сита» (см. рис. 8.9), однако при этом нельзя объяснить селективность канала по отношению к достаточно малым ионам. На рис. 8.10 приведен профиль свободной энергии для диффузии ионов Na^+ через канал. Если лимитирующей стадией является дегидратация, то параметром, определяющим высоту энергетического барьера, будет геометрия тех компонентов, которые временно заменяют воду (пик В на рис. 8.10, В). Для K^+ положение соот-

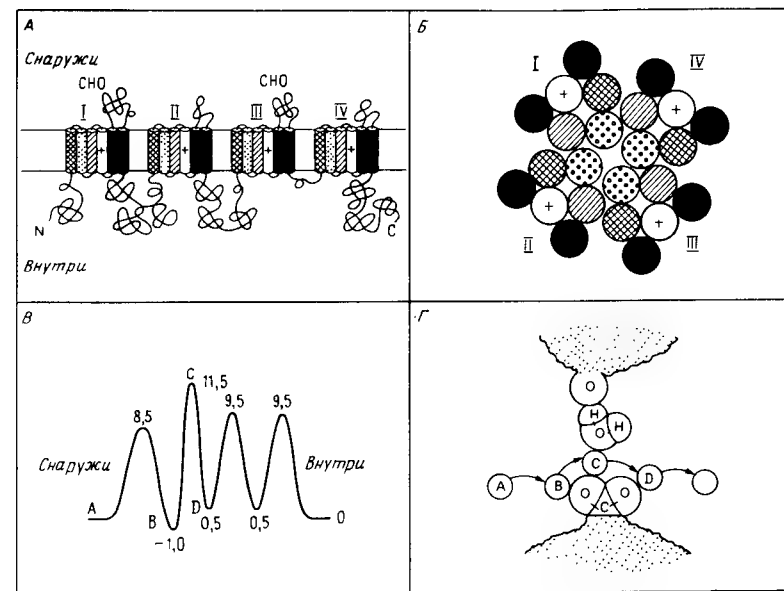


Рис. 8.10. Некоторые модели натриевого канала. А. Модель укладки полипептидной цепи; показаны четыре гомологичных домена, каждый из которых имеет шесть трансмембранных спиралей. Знаком + отмечен амфифильный сегмент 4. Б. Гипотетическая организация шести спиралей каждого домена, образующих центральный канал (вид сверху). В. Профиль свободной энергии, согласующийся с данными о потоке Na^+ через канал. Числа — значения энергии в единицах RT относительно основного раствора. Предполагается, что имеются три места связывания и четыре энергетических барьера. Г. Гипотетическая модель узкого «селективного фильтра», определяющего высоту барьера С. Гидратированный ион должен последовательно пройти через положения А, В, С и D, и высота кинетического барьера будет зависеть главным образом от соотношения между расстоянием от карбоксильной группы до карбонильной и размером иона. Из работ [1076] (А,Б) и [633а] (В,Г).

ветствующих групп не будет оптимальным, поскольку этот ион несколько больше по диаметру, а потому энергетический барьер будет выше. Напротив, для K^+ -селективных каналов соответствующий энергетический барьер будет минимален именно для ионов K^+ .

В последнее время было построено также много моделей, описывающих регуляцию работы канала при помощи трансмембранного потенциала [546, 565, 368]. В регуляции, без сомнения, участвует изменение заряда белка в ответ на наложение электрического поля. Однако никаких данных о том, какие именно участки полипептида образуют ворота или отвечают на изменение напряжения, не существует. Высказывается предположение, что это может быть амфифильная S4-спираль.

Данные об аминокислотной последовательности натриевого канала свидетельствуют о том, что он относится к группе потенциал-зависимых каналов (табл. 8.2). В эту же группу входят калиевый канал из *Drosophila* [1443] и дигидропиридиновый калиевый канал из скелетных мышц кролика [1431]. Все эти белки содержат амфифильный положительно заряженный сегмент, аналогичный S4-сегменту натриевого канала. Это еще раз подтверждает вывод о том, что данный сегмент участвует в регуляции работы канала, отвечая на изменение напряжения на мембране. Отметим, что как натриевый канал из тканей млекопитающих, так и кальциевый канал (следующий раздел) имеют субъединицы, функции которых неизвестны.

8.2.6. КАЛЬЦИЕВЫЙ КАНАЛ [992, 1470]

Ca^{2+} -селективные каналы очень широко распространены в возбудимых клетках — нервных и мышечных, а также в большинстве других типов клеток. Некоторые Ca^{2+} -каналы отвечают на изменение напряжения на мембране, а работа других регулируется опосредованно с помощью рецепторов (гл. 9). Обычно концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме не превышает 10^{-7} М, что в 10 000 раз ниже, чем концентрация ионов Ca^{2+} вне клетки. Из-за этих условий и в отличие от Na^{+} - и K^{+} -каналов открывание Ca^{2+} -канала может приводить к значительным изменениям концентрации этого иона в цитоплазме, что в свою очередь индуцирует разнообразные биохимические события. Например, потенциалзависимое увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме приводит к высвобождению нейромедиаторов (таких, как ацетилхолин из пресинаптической мембраны).

Исходя из фармакологических данных, была проведена классификация Ca^{2+} -каналов. Для очистки и дальнейшей характеристики каналов очень полезными оказались органические блокирующие агенты с высоким сродством к каналам. Единственный класс Ca^{2+} -каналов, охарактеризованных биохимически, — это потенциалзависимые каналы, которые блокируются различными органическими соединениями, в частности производными дигидропиридина. Эти каналы были выделены из сердечной и скелетной мышц и оказались одинаковыми [241, 1422]. Они состоят как минимум из двух субъединиц с мол. массой 140 000 и 30 000. Большая субъединица была клонирована и секвенирована и оказалась структурно близка к потенциалзависимому натриевому каналу [1431].

8.2.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появляется все больше данных, свидетельствующих о сходстве структуры различных каналов и пор. В основе всех этих систем ле-

жит заполненная водой пора, выстланная изнутри полярными группами. Пора может быть образована или α -спиральными, или β -структурными элементами. Чтобы транспорт осуществлялся с высокой скоростью, в канале не обязательно должны присутствовать места связывания, обладающие высоким сродством к переносимым веществам, поскольку селективность определяется высотой энергетических барьеров, а не глубиной впадин (см. рис. 8.1). Селективность каналов можно в большинстве случаев объяснить тем, что в нескольких ключевых местах располагаются специфические аминокислотные остатки, определяющие характер тех веществ, которые могут проходить через канал. Возможно, воротные механизмы различных каналов также имеют много общего, но экспериментальные данные по этому поводу пока отсутствуют.

Как мы увидим позже, аналогичные структурные свойства можно обнаружить и у других транспортных белков.

8.3. Некоторые унипортеры, симпортеры и антипортеры

К настоящему времени достаточно хорошо охарактеризовано несколько систем, катализирующих транспорт одного или более растворимых веществ. При этом скорость переноса с помощью этих белковых комплексов гораздо ниже, чем даже через наиболее «медленные» каналы. В данном разделе мы рассмотрим переносчик глюкозы и анионный переносчик (белок полосы 3) из мембраны эритроцита, лактозопермеазу из *E. coli* и группу митохондриальных переносчиков. Транспортные функции этих белков весьма разнообразны: они катализируют облегченную диффузию одного какого-то вещества, импорт H^{+} и сахара, в результате чего происходит накопление сахара в клетке, и антипорт растворенного вещества. Отметим некоторые общие свойства этих процессов.

1. В некоторых случаях эти транспортные белки являются олигомерами, обычно димерами [763]. Однако, по-видимому, только у митохондриальных переносчиков (например, у системы обмена АТФ/АДП) канал образуется из структурных элементов разных мономеров. Во всех других случаях, по всей вероятности, каждая субъединица функционирует независимо, даже если она является частью олигомера.

2. Весьма высокая степень гомологии транспортных белков указывает на их близкое структурное родство, хотя они существенно различаются как по субстратной специфичности, так и по функциям (см. табл. 8.2). Это позволяет предположить, что для широкой группы функционально различных переносчиков характерны общие транспортные механизмы.

3. В большинстве случаев для анализа работы транспортных белков можно с успехом использовать модели с чередованием конформационных состояний, аналогичные модели, схематически представленной на рис. 8.2. При этом лимитирующей стадией является конформационное изменение с той стороны мембраны, где находится место связывания.

4. В большинстве случаев сродство переносчика к транспортируемому веществу не зависит от того, к какой стороне мембраны обращено место связывания. Однако для первичных активных транспортных систем (см. разд. 8.4) наблюдается иная картина.

5. Все рассматриваемые здесь переносчики обычно чувствительны к реагентам, действие которых направлено на сульфгидрильные группы. Однако это не обязательно должно означать, что между переносчиками имеется значительное структурное сходство или они используют одинаковый механизм транспорта. Например, установлено, что ни один из восьми остатков цистеина лактозопермеазы не участвует непосредственно в транспорте. Высказывалось также предположение, что погруженные в мембрану остатки пролина распределены в транспортных белках непропорционально ([133]; разд. 3.6.4), однако значение этого факта остается неясным.

8.3.1. ПЕРЕНОСЧИК ГЛЮКОЗЫ ИЗ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА (см. также разд. 8.5)

Этот переносчик охарактеризован наиболее полно из всех белков, катализирующих диффузию единственного вещества через мембрану. Он переносит через эритроцитарную мембрану D-глюкозу, которая затем используется при гликолизе. Такие же или аналогичные переносчики глюкозы присутствуют и в других типах животных клеток. Большой прогресс в этой области исследований был достигнут благодаря секвенированию ДНК, кодирующей переносчик глюкозы из клеток гепатомы человека [1027] и из клеток мозга крысы [100]. Очищенный переносчик из эритроцитов представляет собой гликопротеин с кажущейся мол. массой 55 000. По-видимому, в мембране он находится в виде димера. Если судить по данным об аминокислотной последовательности, то переносчик должен содержать 12 трансмембранных α -спиральных участков, однако экспериментальные данные не дают окончательного ответа на этот вопрос [1027, 202, 287]. Очищенный переносчик удалось встроить в фосфолипидные везикулы, при этом оказалось, что он ориентирован асимметрично ([202]; см. также гл. 6).

Как и при исследовании канальных белков, очень важную роль сыграли опыты с использованием специфических ингибиторов, обладающих высоким сродством к переносчику. В число этих ингибиторов входят цитохалазин В и флоретин, которые связываются с

переносчиком со стехиометрией 1:1 [790]. Одни ингибиторы (цитохалазин В) связываются с переносчиком только в том случае, если они находятся с цитоплазматической стороны мембраны, другие специфически связываются с наружной стороны мембраны (флоретин) [790]. В работе [642] было показано, что места связывания двух указанных ингибиторов находятся вблизи С-конца полипептида.

Большинство (но не все [615]) кинетических данных и данных по связыванию согласуются с простой моделью четырех состояний (рис. 8.2), в которой предполагается, что существует единственное место связывания D-глюкозы, находящееся внутри канала. Для измерения индивидуальных констант скоростей использовали ЯМР [1549] и метод остановленной струи [42]. Конформация загруженного канала изменяется с константой скорости 2000 с^{-1} , которая приблизительно в семь раз выше аналогичной константы для незагруженного канала (300 с^{-1} при 23°C). Следовательно, обмен глюкозы происходит с большей скоростью, чем транспорт как таковой, для осуществления которого незагруженный переносчик должен возвратиться через мембрану. Природа конформационного изменения неизвестна, хотя оно было зарегистрировано при помощи инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье [28] и, как предполагают, включает скольжение α -спиралей друг относительно друга [1549].

Между переносчиком глюкозы из клеток млекопитающих и некоторыми транспортными системами бактерий наблюдается значительная гомология [906, 290]. Удивительно, что такая гомология наблюдается также между переносчиком глюкозы и белками, осуществляющими симпорт H^+ -арабинозы и H^+ -ксилозы. Эти симпортеры, как и описываемая ниже система транспорта H^+ -лактозы, используют для аккумуляции указанных сахаров электрохимический протонный градиент. Переносчик глюкозы из мембраны эритроцитов не транспортирует H^+ и не способен к транспорту против градиента глюкозы. Очень важными представляются работы по изучению взаимосвязи структуры белкового комплекса и механизма его работы.

8.3.2. ЛАКТОЗОПЕРМЕАЗА ИЗ *E. coli* [1608, 717, 716]

Этот комплекс изучен наиболее полно из всех симпортных белков. Он кодируется *lacY*-геном, который является частью *lac*-оперона, и его часто называют *lac*-пермеазой. Ген *lacY* был клонирован и секвенирован, и из штамма-сверхпродуцента был выделен белок — продукт этого гена. Пермеазу можно изучать в цитоплазматических мембранных везикулах (кабакосомах), в интактных клетках или в реконструированных протеолипосомах. Судя по дан-

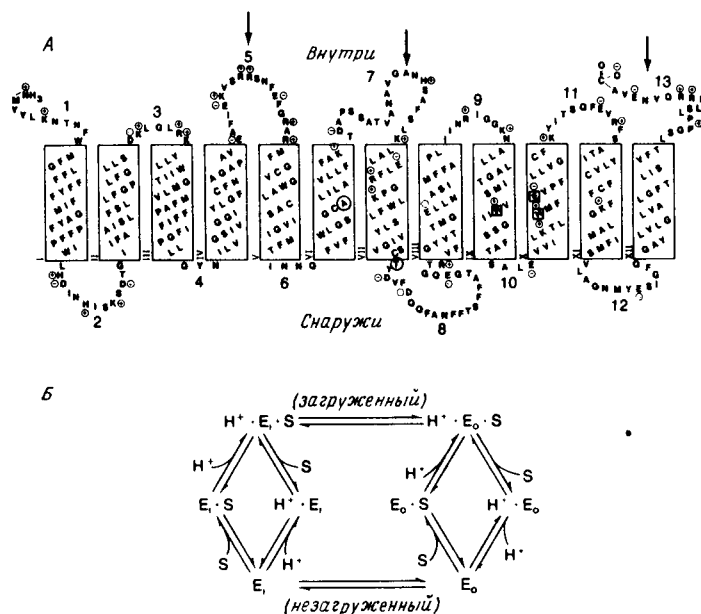


Рис. 8.11. Аминокислотная последовательность H^+ -лактопермеазы из *E. coli* (А) и кинетическая схема, используемая для анализа работы этой системы (Б) [716]. Аминокислотные остатки, заключенные в кружки, определяют субстратную специфичность (специфичность связывания сахара), а остатки, заключенные в квадратики, участвуют в сопряжении протонирования и транспорта лактозы. Стрелками отмечены участки, которые, по данным эксперимента, выступают в цитоплазму. Е и E_0 — конформации пермеазы, в которых места связывания субстрата обращены к цитоплазме или к периплазме соответственно.

ным об аминокислотной последовательности, белок имеет мол. массу 46 500, хотя результаты электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН дают другую величину (гл. 3). Почти не вызывает сомнения, что функциональной единицей в мембране является мономер [253], хотя некоторые данные свидетельствуют о существовании димерной формы пермеазы *in vivo* [1608, 716].

На основании данных об аминокислотной последовательности лактопермеазы были построены модели, согласно которым этот белок имеет 12 или 14 трансмембранных α -спиралей [716, 1525]. Это в основном согласуется со спектроскопическими данными, свидетельствующими о высоком содержании α -спиралей, и немногочисленными топологическими данными. На рис. 8.11 представлена модель, построенная Кабаком, с указанием сегментов, которые, согласно экспериментальным данным, являются цито- или периплазматическими [1314].

Кинетику транспорта с помощью пермеазы изучали, используя подходы, описанные в разд. 8.1.3: 1) выведение лактозы по градиенту или транспорт в везикулы (нуль с *транс*-стороны); 2) активный транспорт лактозы против градиента концентрации, сопряженный с протонным электрохимическим градиентом; 3) равновесный обмен; 4) противоток (бесконечность с *цис*-стороны). Для анализа данных можно использовать кинетическую схему, представленную на рис. 8.11 [1607], хотя между двумя различными группами ученых имеются существенные разногласия по этому поводу [1607]. Однако основные особенности транспорта с участием лактопермеазы представляются достаточно ясными.

1. Пермеаза имеет одно или более мест связывания для протона и одно — для лактозы. Эти места бывают поочередно обращены к периплазматической и цитоплазматической сторонам мембраны, и соответствующий конформационный переход является лимитирующей стадией процесса [1607]. Максимальная скорость транспорта равна $25\text{--}50\text{ с}^{-1}$. При наличии трансмембранного протонного электрохимического потенциала ($\Delta\mu_{H^+}$) K_M для лактозы составляет $\sim 80\text{ мкМ}$; место связывания протона, возможно, характеризуется высоким pK_a , поэтому большую часть времени протонировано. При $\Delta\mu_{H^+} = 0$ значение K_M для лактозы гораздо выше — $15\text{--}20\text{ мМ}$.

2. Транспорт лактозы обязательно сопровождается транспортом H^+ со стехиометрией 1:1.

3. Конечным результатом транспорта является перенос через бислой положительного заряда. Следовательно, важную роль в установлении равновесия и скорости транспорта играют трансмембранный электрический потенциал ($\Delta\psi$) и разность протонного химического потенциала (ΔpH) [1608, 716] (см. также разд. 7.4.2).

Дополнение 8.4. Генетические подходы и сайт-специфический мутагенез: важные методы изучения лактопермеазы

Наиболее ценные данные при изучении лактопермеазы были получены с помощью генетических методов [717, 151, 970]. Эти работы начали проводить сравнительно недавно, но уже ясно, что такого рода подходы помогут получить важные результаты при изучении как этой, так и других транспортных систем. С помощью направленного мутагенеза было показано, что при замене аланина-177 или тирозина-236 данная пермеаза может переносить мальтозу. Эти сайты, отмеченные на рис. 8.11 кружками, могут участвовать в связывании сахара.

Кабак и его коллеги использовали сайт-специфический мутагенез для изучения механизма функционирования пермеазы. Было показано, что замена многих аминокислот не оказывает заметного влияния на кинетику транспорта. Это означает, что данные аминокислоты не принимают прямого участия в транспорте; более того — их замена не приводит к «глобальным» конформационным изменениям белкового комплекса и не препятствует нормальной организации комплекса в мембране.

Были выделены три мутантные формы, неспособные катализировать определение стадии транспорта [717, 790]. Особенно существенны для нормального транспорта гистидин-322, глутамат-325 и аргинин-302; возможно, эти аминокислоты участвуют в переносе заряда внутри мембраны. Было высказано предположение, что они образуют некую связанную водородными связями группу между спиралями 9 и 10 (рис. 8.11). Пермеаза, в которой глутамат-325 заменен на аланин, не может катализировать активный транспорт или выведение лактозы, но способна осуществлять нормальный обмен лактозы (разд. 8.1.3). Следовательно, нагруженная форма переносчика может претерпевать нормальные конформационные изменения, блокируется же какая-то другая стадия полного цикла, возможно депротонирование пермеазы. Можно надеяться, что именно с помощью такого рода экспериментов удастся понять механизм работы данного переносчика. При этом очевидно, что в интерпретации результатов ключевую роль могло бы сыграть установление трехмерной структуры фермента.

Как у *E. coli*, так и у высших организмов имеются другие системы симпорта сахара и катионов [1608]. Однако лактозопермеаза не гомологична ни переносчикам H^+ -ксилозы или H^+ -арабинозы, ни переносчику глюкозы млекопитающих, описанному в предыдущем разделе. Никакой гомологии не было обнаружено также между лактозопермеазой и мелибиозопермеазой из *E. coli* [1608, 717]. Последняя использует в качестве движущей силы для накопления мелибиозы симпорт не только H^+ , но также и Na^+ . Способность использовать Na^+ , по всей вероятности, исключает механизмы с перескакиванием протона по сети водородных связей в пронизывающей мембрану части переносчика. Известен также некий переносчик Na^+ -глюкозы, который катализирует накопление глюкозы в клетках щеточной каемки кишечника [1608, 1135, 1610].

8.3.3. БЕЛОК ПОЛОСЫ 3 — АНИОННЫЙ ПЕРЕНОСЧИК ИЗ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ [703, 876]

На долю белка полосы 3 приходится около 25% общего количества мембранных белков эритроцита человека; сходные белки присутствуют также в незритроидных клетках [322]. Этот белок выполняет несколько функций, причем их можно соотнести с двумя основными доменами белковой молекулы. N-концевая часть (41 000 Да) является гидрофильной и локализована с цитоплазматической стороны эритроцитарной мембраны. Она содержит места связывания для компонентов цитоскелета (анкирина), а также для ферментов гликолиза и гемоглобина ([876]; см. также разд. 4.3.4 и 6.7.2). Этот домен можно удалить путем протеолиза, не затронув С-концевого домена (52 000 Да), который остается связанным с мембраной и опосредует Cl^-/HCO_3^- -обмен (разд. 8.1.1), а также образует канал в мембране, через который может проникать вода (разд. 7.2.1). Внецитоплазматический компонент этой части белка содержит также углеводные антигенные детерминанты нескольких систем групп крови. В мембране белок полосы 3 находится в форме димера или тетрамера.

Было проведено клонирование и секвенирование участка кДНК, кодирующего белок полосы 3 из эритроцитов мыши [774]. Эти данные послужили основой для построения модели белка полосы 3 [775, 774]. Было высказано предположение, что он имеет 12 трансмембранных α -спиралей, при этом некоторые из них являются амфифильными. Экспериментальные данные, подтверждающие эту гипотезу, получены только для нескольких участков полипептида и основаны главным образом на результатах протеолиза и локализации связанных углеводов.

Обширные кинетические исследования согласуются с моделью с чередованием конформаций и одним местом связывания (см. рис. 8.2). Однако скорость равновесного анионного обмена с помощью переносчика по меньшей мере в 10^4 раз превышает скорость транспорта как такового. Следовательно, незагруженный переносчик не претерпевает быстрых конформационных превращений, необходимых для того, чтобы анион мог связаться с мембраной. По данным ЯМР с использованием ^{35}Cl , у переносчика имеется единственное место связывания, и оно может быть обращено как внутрь, так и наружу [408, 411]. Результаты опытов с использованием ингибиторов транспорта [412, 410, 409] тоже свидетельствуют о том, что в канале имеется единственное место связывания аниона, локализованное где-то в середине канала. При этом предполагается, что переход этого места связывания с одной стороны мембраны на другую блокируется неким «скользящим барьером», который перемещается вдоль канала в результате конформационных изменений. Лимитирующей стадией является конформационный переход

нагруженного переносчика, но происходит он достаточно быстро, с частотой 10^5 с^{-1} при 37°C . По-видимому, такая высокая скорость предотвращает значительные конформационные изменения в белке. Природа этого конформационного перехода и точная структура канала экспериментально не определены.

Конформационный переход загруженного переносчика, лимитирующий весь транспортный процесс, лишь в очень малой степени зависит от мембранного потенциала. Это согласуется с таким конформационным переходом, в результате которого через мембрану перемещается 0,1 связанного с белком заряда [556]. Если этот переход сопряжен с перемещением анионного субстрата, то он должен сопровождаться переносом противоиона, например заряженной аминокислотной группы. В отличие от этого потенциалзависимое конформационное изменение, индуцирующее открывание натриевого канала, приводит к результирующему перемещению через мембрану шести связанных с белком зарядов [193].

8.3.4. ГРУППА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ [45]

Гомологичность некоторых транспортных белков внутренней митохондриальной мембраны свидетельствует об их близком родстве: по всей вероятности, они произошли от общего предка в результате дивергентной эволюции (табл. 8.2). Имеются по меньшей мере три представителя этой группы: 1) ADP/ATP-транслоказа; 2) переносчик фосфата [1260] и 3) разобщающий белок. В структуре этих белков имеется много общего, и тем не менее они существенно различаются по субстратной специфичности. ADP/ATP-транслоказа катализирует транспорт ADP и ATP через бислой. При физиологических условиях ATP транспортируется из митохондрий, а ADP переносится в матрикс. Механизм этого процесса, по-видимому, аналогичен таковому для белка полосы 3, за исключением того, что ATP несет на один отрицательный заряд больше, чем ADP, и поэтому обмен зависит от трансмембранного электрического потенциала на митохондриальной мембране. Переносчик фосфата осуществляет одновременно и симпорт H^+ , и, во-видимому, механизм его работы сходен с описанным ранее механизмом для H^+ -лактозопермеазы из *E. coli* (разд. 8.3.2). Этот белок катализирует транспорт фосфата внутрь митохондрий. Благодаря симпорту H^+ процесс в целом является электронейтральным и не зависит от трансмембранного потенциала. Разобщающий белок [420] был обнаружен в митохондриях из клеток бурого жира млекопитающих; его функция заключается в диссипации протонного электрохимического градиента, создаваемого при функционировании дыхательной цепи, в результате чего генерируется тепло. Разобщающий белок может так-

же катализировать транспорт анионов, например Cl^- , так что, может быть, на самом деле он катализирует транспорт OH^- , который невозможно экспериментально отличить от транспорта H^+ . Этот переносчик связывается с нуклеотидами, которые ингибируют транспорт, и его работа может регулироваться жирными кислотами.

Все три переносчика, а возможно, еще и α -кетоглутарат/малат-транслоказа [1260], имеют сходное строение; этот вывод был сделан на основе данных об их аминокислотной последовательности. Все они имеют мол. массу около 33 000 Да и состоят из трех гомологичных доменов, каждый из которых содержит ~ 100 аминокислот. По всей вероятности, эти три домена образовались в результате утроения единственного гена. Была построена модель, согласно которой каждый из гомологичных доменов дважды пересекает мембрану, а вся субъединица содержит шесть трансмембранных α -спиралей. С этой моделью согласуются данные по химической модификации. Отметим, что такая структура имеет много общего с Na^+ -каналом, состоящим из четырех родственных гомологичных доменов. ADP/ATP-транслоказа является димером и, по-видимому, содержит единственный канал, по которому осуществляется транспорт [45]. Такой вывод основывается на результатах исследований по связыванию ингибиторов с высоким сродством (например, карбоксиатрактилозида).

К ADP/ATP-транслоказе мы вернемся в гл. 10, в которой будем обсуждать механизм переноса этого белка из цитоплазмы, где он синтезируется, во внутреннюю митохондриальную мембрану.

8.4. Несколько примеров активных переносчиков, использующих энергию гидролиза ATP или фосфоенолпирувата

Сделаем несколько замечаний, касающихся первичных активных переносчиков. Охарактеризовано довольно много систем, с помощью которых происходит сопряжение транспорта тех или иных веществ через мембрану с гидролизом макроэргической фосфатной связи или с другой реакцией, в ходе которой высвобождается энергия. Мы не стремимся дать подробный анализ обширной литературы по данному вопросу, а хотим лишь отметить некоторые основные особенности строения и механизма работы этих транспортных систем в контексте того, что мы уже узнали о других группах транспортных белков.

Как мы уже отмечали, в основе кинетических моделей многих первичных активных транспортных систем лежит концепция чередования конформационных изменений (рис. 8.2). При этом совер-

шенно необязательно, чтобы реакция, в ходе которой высвобождается энергия, например реакция гидролиза АТР, была прямо сопряжена с конформационным переходом, необходимым для транспорта, как это показано на рис. 8.2; важно лишь, чтобы такое сопряжение существовало с одной или несколькими стадиями кинетического цикла. Требования, предъявляемые к структуре трансмембранного «канала» первичного активного переносчика, аналогичны таковым для других переносчиков (это обсуждалось в предыдущих разделах), но здесь возникает дополнительная сложность — необходимость контроля сопряжения химической реакции, в ходе которой высвобождается энергия, и транспорта растворимого вещества.

О молекулярной структуре первичных активных транспортных систем известно даже меньше, чем о транспортных белках, обсуждавшихся ранее в этой главе. Идентифицировать группы родственных переносчиков, близких по строению и механизму работы, помогают данные об их аминокислотной последовательности, которых становится все больше (табл. 8.5). Однако достоверные данные о том, каково строение участков, непосредственно вовлеченных в транспорт веществ, отсутствуют. В основе различного рода структурных моделей активных переносчиков лежит предположение о том, что трансмембранный канал, через который транспортируются вещества, образован кластером трансмембранных амфифильных α -спиралей. Сходным образом и модели, описывающие сопряжение химических реакций и транспорта веществ, опираются на весьма немногочисленные экспериментальные данные. Модели сопряжения можно разделить на две главные группы. Согласно *модели прямого сопряжения*, химическая реакция оказывает непосредственное влияние на перенос транспортируемого вещества, причем этот процесс не требует значительных опосредованных белком конформационных изменений. Например, протоны, участвующие в гидролизе АТР, могли бы быть именно теми ионами, которые транспортируются через мембрану в ходе данной реакции [1286]. Для этого необходимо, чтобы участок комплекса, где протекает химическая реакция (например, гидролиз АТР), и участок связывания транспортируемого вещества были расположены очень близко друг к другу. В отличие от этого в *модели непрямого сопряжения* химическая реакция оказывает влияние на транспортный процесс через опосредованные белком конформационные изменения. Допускается даже, что химическая реакция и активный транспорт могут быть связаны с разными субъединицами внутри комплекса. Эти модели имеют то преимущество, что с их помощью нетрудно объяснить транспорт различных веществ (например, Na^+ , H^+) одними и теми же или близкородственными белками при участии одних и тех же механизмов.

Активные транспортные системы функционируют со скоростями, типичными для многих ферментов, т. е. 10^2 — 10^3 с^{-1} в условиях насыщения. В отличие от канальных белков селективность в отношении субстрата обуславливается главным образом сродством транспортируемого вещества к активному переносчику. Более того, большинство первичных активных переносчиков обычно функционирует в условиях, когда концентрация переносимого вещества с *цис*-стороны близка или немного превышает K_m и лимитирующей стадией транспорта является конформационный переход белка или химическая реакция, служащая источником энергии для данной системы.

И наконец, роль первичных активных транспортных систем заключается в перемещении вещества через мембрану против его концентрационного градиента в одном направлении (*цис* $\rightarrow$ *транс*). Поскольку переносчик после высвобождения транспортируемого вещества должен опять изменить свою ориентацию с *транс* на *цис*, необходим какой-то механизм, препятствующий возвращению на *цис*-сторону загруженного переносчика (т. е. обратному транспорту вещества). Следовательно, сродство активного переносчика к транспортируемому веществу должно быть выше с *цис*-стороны (где этот субстрат при низких концентрациях связывается с переносчиком), чем с *транс*-стороны (где оно диссоциирует при гораздо более высоких концентрациях). Если бы это было не так, переносчик работал бы очень неэффективно при высоких концентрациях субстрата с *транс*-стороны. В такой реакции энергия затрачивается главным образом на изменение сродства переносчика к транспортируемому веществу. Например, фосфорилирование Na^+/K^+ -АТРазы или Ca^{2+} -АТРазы при помощи АТР ведет к стабилизации конформации тех переносчиков, у которых место связывания ионов обращено наружу и которые имеют низкое сродство соответственно к Na^+ или Ca^{2+} . В то же время связывание АТР стабилизирует ту форму Na^+/K^+ -АТРазы, в которой места связывания ионов, обращенные к цитоплазме, имеют низкое сродство к K^+ (см. следующий раздел и рис. 8.12). Следовательно, механизм сопряжения реакции, в ходе которой высвобождается энергия, и транспорта, катализируемого активными переносчиками, лучше всего рассматривать исходя из термодинамических принципов, т. е. как временную стабилизацию определенных конформаций и изменение сродства к транспортируемому веществу.

Можно выделить пять групп переносчиков, которые используют свободную энергию макроэргической фосфатной связи для осуществления транспорта веществ, т. е. Природа нашла несколько путей решения этой задачи.

8.4.1. ПЕРЕНОСЧИКИ КАТИОНОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ (E_1E_2 -ТИПА): АТР-ЗАВИСИМЫЕ ИОННЫЕ НАСОСЫ [1134, 1386]

Несколько про- и эукариотических ионпереносящих АТРАЗ составляют единое семейство и обладают сходными аминокислотными последовательностями и механизмами переноса ионов (табл. 8.5). Наиболее полно охарактеризованы Na^+/K^+ -АТРаза из

Таблица 8.5. Некоторые АТРаза, участвующие в транспорте ионов [1134]

I. E_1E_2 -типа	Источник	Мембрана
Транспортируемые ионы		
H^+	Низшие эукариоты (дрожжи, грибы)	Плазматическая
H^+	Высшие эукариоты	То же
	Растения	Плазматическая (опухоль)
	Животные	Плазматическая
K^+	<i>E. coli</i> , <i>S. faecalis</i>	Цитоплазматическая
H^+/K^+	Высшие эукариоты (животные)	Плазматическая
Na^+/K^+	То же	—''—
Ca^{2+}	—''—	—''—
Ca^{2+}	—''—	Саркоплазматическая
II. F_1F_0 -типа	Источник	Мембрана
Транспортируемые ионы		
H^+	Большинство бактерий	Цитоплазматическая
H^+	Эукариоты	
H^+	Животные, растения	Внутренняя митохондриальная
H^+	Растения	Тилаконды
		хлоропластов
III. Вакулярного типа	Источник	Мембрана
Транспортируемые ионы		
H^+	Низшие эукариоты (дрожжи, грибы)	Вакуоли
H^+	Высшие эукариоты (растения)	Тонoplastы
H^+	Высшие эукариоты (животные)	Лизосомы
H^+	То же	Эндосомы
H^+	—''—	Секреторные гранулы
H^+	—''—	Запасные гранулы
H^+	—''—	Окаймленные везикулы

плазматической мембраны животных клеток и Ca^{2+} -АТРаза из саркоплазматического ретикулума (см. разд. 6.5). Большинство ферментов этой группы представляют собой единый полипептид с мол. массой 100 000; исключение составляет Na^+/K^+ -АТРаза, выделенная из нескольких источников, которая содержит вторую, меньшую субъединицу с неизвестной функцией. Эти переносчики ингибируются ванадатом и прямо фосфорилируются АТР с образованием фосфорилированного интермедидата, играющего важную роль в транспорте (см. рис. 8.12). Катионные переносчики этой группы значительно различаются по ионной специфичности (см. табл. 8.5). Неодинакова и стехиометрия транспорта. Например, Ca^{2+} -АТРаза переносит $2\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ в полость саркоплазматического ретикулума, в то время как Na^+/K^+ -АТРаза переносит 3Na^+ наружу и 2K^+ в цитоплазму через плазматическую мембрану. При этом различия в работе АТРаза касаются не только стехиометрии и природы переносимых ионов, но также и того, что Ca^{2+} -АТРаза способна переносить ионы лишь в одном направлении, в то время как Na^+/K^+ -АТРаза делает это в обоих направлениях.

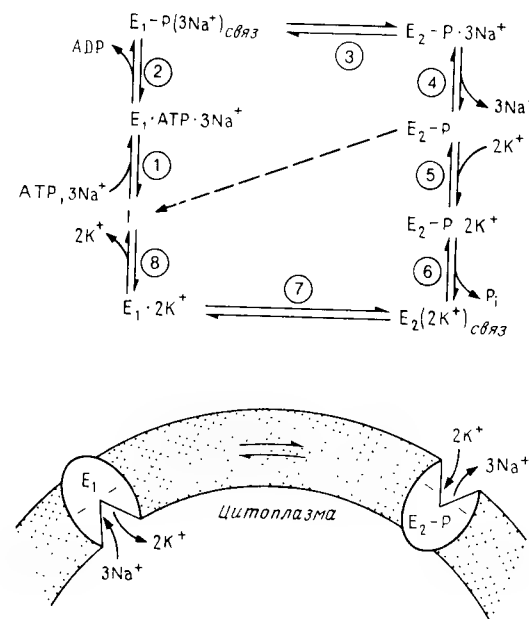


Рис. 8.12. Кинетическая схема для Na^+/K^+ -АТРаза. Для Ca^{2+} -АТРаза можно использовать тот же механизм, за исключением того, что вслед за дефосфорилированием $E_2\text{-P}$ переносчик возвращается в конформацию E_1 в незагруженном состоянии (пунктирная линия).

Название «фермент E_1E_2 -типа» было введено в работе, посвященной Na^+/K^+ -АТФазе. Как показали исследования, этот белок существует по меньшей мере в двух различающихся конформациях, для которых характерны разное связывание субстратов и неодинаковая подверженность мягкому протеолизу [39, 714]. Форма E_1 соответствует конформации, в которой места связывания ионов обращены в сторону цитоплазмы (высокое сродство к Na^+ , низкое — к K^+) и которая обладает высоким сродством к АТФ. Места связывания ионов в фосфорилированной форме E_2 обращены наружу (высокое сродство к K^+ , низкое — к Na^+). На рис. 8.12 изображен транспортный цикл, в котором участвуют две ненагруженные формы переносчика и две нагруженные, $E_2(2K^+)_{связ}$ и $E_1(3Na^+)_{связ}$ со «спрятанными» внутри насосного комплекса ионами. Изучение связывания K^+ фосфорилированной формой переносчика (E_2-P) показало, что оно происходит в двух разных местах [446].

Отметим основные особенности каталитического цикла.

1. E_1 -форма связывает три иона Na^+ с цитоплазматической стороны мембраны и затем взаимодействует с АТФ, образуя фосфорилированный фермент. Фосфорилируется при этом специфический аспарат, консервативный в этой группе ферментов.

2. После отсоединения АДФ ионы оказываются «спрятанными» внутри комплекса.

3. Фосфорилирование белка стабилизирует конформацию с низким сродством к Na^+ ; при этом места связывания ионов обращены наружу. Это способствует переходу $E_1-P \rightarrow E_2-P$, в результате которого и осуществляется перенос.

4. В форме E_2-P места связывания ионов обращены во внеклеточную среду; эта конформация обладает высоким сродством к K^+ , который связывается, катализирует дефосфорилирование и остается «спрятанным» внутри комплекса. Обратите внимание, что Na^+ необходим для быстрого фосфорилирования, а K^+ — для быстрого дефосфорилирования. Ванадат связывается с формой E_2 , возможно, как некий аналог переходного состояния фосфата. У других ферментов E_1E_2 -типа, например Ca^{2+} -АТФазы [1376], форма E_2-P дефосфорилируется и переходит в форму E_1 , которая в свою очередь переходит в незагруженную форму.

5. Лимитирующей стадией каталитического цикла является, по всей вероятности, освобождение K^+ и переход его из связанного с ферментом состояния в свободное. Этот процесс стимулируется связыванием АТФ с сайтом, обладающим низким сродством [447]. Следовательно, АТФ выполняет две разные функции, выступая в качестве субстрата и аллостерического эффектора. Сколько мест связывания АТФ имеет фермент, пока неясно.

Определена аминокислотная последовательность нескольких АТФаз E_1E_2 -типа, включая Na^+/K^+ -АТФазу (α -субъединица) из не-

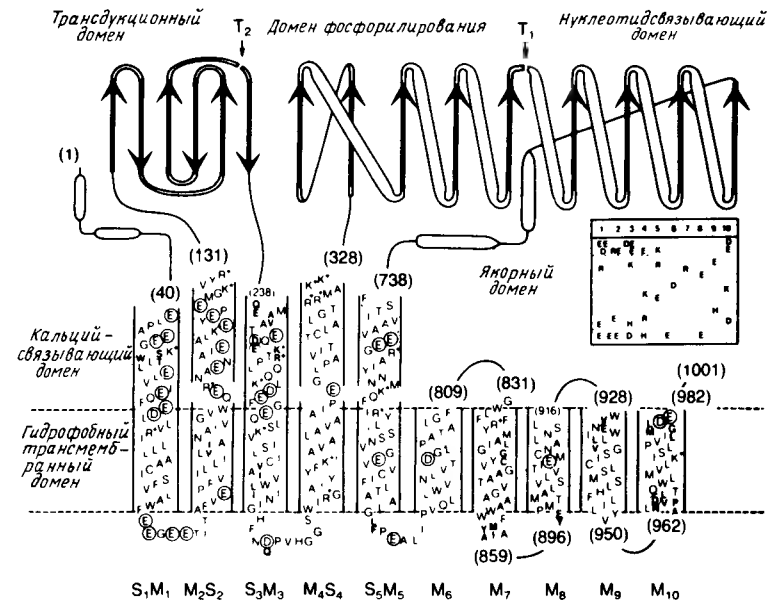


Рис. 8.13. Теоретическая структурная модель Ca^{2+} -АТФазы [134]. Фермент содержит 10 трансмембранных α -спиралей, 5 дополнительных α -спиралей, образующих «ножку», и объемную глобулярную часть с цитоплазматической стороны, состоящую из трех доменов. Буквами T_1 и T_2 отмечены участки, подвергающиеся протеолитическому расщеплению. На врезке показано распределение заряженных аминокислотных остатков, которые, как предполагается, расположены внутри мембраны или вблизи нее: отрицательные (D, E) и положительные (K, R, H).

скольких источников [1337, 733, 734], Ca^{2+} -АТФазу [902, 134], H^+ -АТФазу из плазматической мембраны дрожжей [1327] и *Neurospora crassa* [572, 3] и K^+ -АТФазу из *S. faecalis* [1362]. Исходя из профилей гидрофобности, были построены модели, согласно которым эти белковые комплексы содержат 6, 8 или 10 трансмембранных α -спиральных сегментов (рис. 8.13). Некоторые участки полипептидов, в том числе и сегмент, содержащий сайт фосфорилирования, в значительной степени гомологичны. Все белки имеют большую гидрофильную петлю, содержащую домены, с которыми, по всей вероятности, связываются нуклеотиды и где происходит фосфорилирование [902].

У Ca^{2+} -АТФазы один расщепляемый трипсином сайт, чувствительный к конформационному переходу $E_1 \rightarrow E_2$, находится в «трансдукционном» домене (рис. 8.13) [35]. Исследовалось также связывание Ca^{2+} с ферментом; было высказано предположение, что транспорту Ca^{2+} предшествует связывание двух ионов Ca^{2+} с опре-

деленными участками внутри белкового комплекса [1433, 678]. По всей вероятности, у Ca^{2+} -АТРАЗы места связывания Ca^{2+} с высоким сродством располагаются на значительном удалении от места связывания нуклеотидов [1373], однако эту гипотезу нужно еще проверить. Основные особенности строения Ca^{2+} -АТРАЗы, представленные на рис. 8.13, согласуются с данными электронной микроскопии, согласно которым этот белковый комплекс сильно выступает из бислоя в цитоплазму [1440]. Вероятно, в условиях *in vivo* АТРАЗы E_1E_2 -типа агрегируют, образуя по меньшей мере димеры, но, как мы уже говорили в гл. 3, подтвердить данное предположение экспериментально очень трудно. Тем не менее очевидно, что мономеры также способны к катализу, по крайней мере в некоторых случаях [528, 1518].

Определена аминокислотная последовательность меньшей β -субъединицы Na^+/K^+ -АТРАЗы. Было высказано предположение, что эта субъединица имеет одну или четыре трансмембранные α -спирали [1630, 1111].

В заключение отметим, что благодаря легкости клонирования этих мембранных АТРАЗ и возможности использования разных экспериментальных подходов эти системы являются отличным объектом для применения к ним направленного мутагенеза и других генетических методов. Подобные методы уже применяются в исследованиях F_1F_0 -АТРАЗ (см. следующий раздел).

8.4.2. АТРАЗы F_1F_0 -ТИПА ИЗ МИТОХОНДРИЙ, ХЛОРОПЛАСТОВ И БАКТЕРИЙ [1134, 128, 654]

Большинство бактерий, а также митохондрии и хлоропласты содержат родственные АТРАЗы F_1F_0 -типа, которые используют трансмембранный протонный электрохимический градиент для синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата. В физиологических условиях эти ферменты являются АТФ-синтазами. Они содержат от 8 (*E. coli*) до 13 (митохондрии сердца быка) различных субъединиц и, таким образом, являются гораздо более сложными структурами, чем АТРАЗы E_1E_2 -типа из плазматических мембран. АТРАЗы F_1F_0 -типа состоят из двух частей: 1) гидрофильного глобулярного F_1 -комплекса, содержащего места связывания нуклеотидов и функционирующего в качестве АТРАЗы, и 2) мембраносвязанного F_0 -комплекса [654], который функционирует как H^+ -проводящий канал. F_1 - и F_0 -комплексы могут отсоединяться друг от друга, а после очистки их можно реконструировать с восстановлением функциональной активности.

F_1 -комплекс из *E. coli* содержит пять субъединиц в стехиометрии $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Между тремя парами $\alpha\beta$ в составе F_1 наблюдается асимметрия, возникающая, по всей вероятности, в результате асиммет-

ричных взаимодействий с другими субъединицами. В составе каждого комплекса имеется по три каталитических центра, и для быстрого оборота фермента необходимо, чтобы АТФ был связан более чем с одним местом связывания. Для объяснения механизма катализа были построены различные модели с чередованием мест связывания, в частности модель, согласно которой в ходе катализа происходит физическое вращение частей фермента [256]. Возможно, в связывании F_1 - и F_0 -компонентов фермента в мембране участвуют δ - и ϵ -субъединицы.

F_0 -комплекс из фермента *E. coli* устроен достаточно просто, он содержит только три субъединицы в стехиометрии $a_1b_2c_{10}$. Все эти субъединицы необходимы для формирования H^+ -проводящего канала [1301]. Остается неясным, можно ли рассматривать F_0 как канал в том смысле, как мы его понимаем в этой главе [859]. Полагают, что H^+ -проводящая часть F_0 образована α -спиралями из множества копий c -субъединицы. По всей вероятности, эта субъединица содержит пять трансмембранных α -спиралей, в то время как a - и b -субъединицы — по одной. Результаты, полученные с помощью генетических методов, согласуются с предположением, согласно которому погруженные в мембрану части всех трех субъединиц играют важную роль в обеспечении протонной проводимости.

Изучение этой системы показывает нам, сколь успешным может быть применение генетических методов для исследования строения мембранных белков, для которых отсутствуют кристаллографические данные высокого разрешения. Очень важно выяснить, приводит ли замена единственной аминокислоты в таком белке к конформационным изменениям, которые скажутся на катализе. По-видимому, результат такой замены сильно зависит от природы переносчика. Например, как мы уже обсуждали, очень обнадеживающими в этом отношении являются данные, полученные для лактозопермеазы. Очевидно, в следующем десятилетии в изучении взаимосвязи между структурой и функцией мембранных белков главную роль будут играть различные генетические методы, в частности направленный мутагенез.

Рассмотрим результаты, полученные к настоящему времени для F_1F_0 -АТРАЗы из *E. coli*.

1. Наличие многочисленных мутантных по ϵ -субъединице форм позволяет идентифицировать участок, являющийся, по всей вероятности, каталитическим нуклеотидсвязывающим доменом [1123, 1122]. Исследование мутантных форм показало также, что между α - и β -субъединицами имеется конформационное сопряжение [1377].

2. Показано, что мутантные по ϵ -субъединице формы неспособны к сопряжению транспорта H^+ с катализируемой комплексом F_1 АТРАЗной активностью [257], а также к связыванию комплексов F_1 и F_0 [764].

3. Показано, что определенные аминокислотные остатки в субъединицах *a* [178], *b* [701] и *c* [424] опосредуют протонную проницаемость; имеющиеся генетические данные позволяют предположить, что субъединица *b* непосредственно контактирует в мембране с субъединицами *a* и *c* [801, 800].

Связаны ли все эти явления с локальными или глобальными конформационными изменениями, покажут дальнейшие исследования. Пока же мы не можем сказать определенно, как происходит сопряжение гидролиза АТФ и транспорта H^+ при работе АТФазы F_1F_0 -типа, а также с чем связана протонная проводимость.

Важными в этом отношении могут оказаться данные о том, что цитоплазматическая мембрана анаэробной бактерии *Propionigenium modestum* содержит Na^+ -зависимую АТФазу F_1F_2 -типа [822]. Если этот фермент работает как первичный АТФ-зависимый Na^+ -насос, то логично предположить, что механизм функционирования H^+ -АТФазы и Na^+ -АТФазы одинаков. Например, это позволит исключить модели прямого сопряжения.

8.4.3. ТРИ ДРУГИХ КЛАССА ПЕРЕНОСЧИКОВ

Помимо АТФ-зависимых активных переносчиков E_1E_2 - и F_1F_0 -типов есть еще три класса активных переносчиков, использующих свободную энергию гидролиза макроэргических фосфатных связей. О реальных механизмах транспорта или сопряжения в этих системах известно немного. Отметим несколько интересных их особенностей.

1. *Бактериальные фосфотрансферазы* [548]. Этот комплекс был обнаружен только в бактериях; он катализирует транспорт сахаров, таких, как глюкоза и маннитол. Уникальной особенностью этой системы является то, что транспорт сахара сопровождается его фосфорилированием. Получаемое фосфатное производное сахара уже не может служить субстратом для переносчика в бактериальной мембране, и таким образом предотвращается обратный поток сахара через эту систему. Вспомним, что в переносчиках E_1E_2 -типа фосфорилирование переносчика стабилизирует форму с низким сродством к переносимому веществу (например, Ca^{2+} или Na^+), что также препятствует обратному переносу транспортируемых веществ.

Конечным донором фосфата в фосфотрансферазной системе является фосфоенолпируват. Фосфат переносится специфической последовательностью растворимых фосфорилированных интермедиатов в цитоплазму к мембраносвязанному транспортному белку, называемому фермент II или ЕII. Существует группа ферментов ЕII-типа, специфичных к разным сахарам, но обладающих сходной первичной структурой [132]. По всей вероятности, внутри мембраны

ферменты ЕII-типа образуют димеры [1388]. Высказывалось предположение, что они формируют каналы [1232]. Эти белки чувствительны к реагентам, действующим на сульфгидрильные группы, и к окислению, что может играть важную роль в условиях *in vivo*. Немного известно о том, каким образом фосфорилированные ферменты ЕII-типа осуществляют транспорт и фосфорилирование сахаров. Разумной представляется модифицированная модель с чередованием конформаций и единственным местом связывания.

2. *Бактериальные периплазматические транспортные системы* [31]. В дополнение к системам симпорта (катион — сахар) и фосфотрансферазной системе бактерии имеют еще одну систему активного транспорта растворимых веществ, которая используется для различных аминокислот и сахаров. Так, охарактеризованы системы, специфичные к гистидину (*S. typhimurium*) и мальтозе (*E. coli*). К сожалению, биохимические данные, которые могли бы дополнить интенсивные генетические исследования мембраносвязанных компонентов этих систем, весьма немногочисленны. Уникальной особенностью этих систем является то, что они содержат субстратспецифичные связывающие белки, локализованные в периплазматическом пространстве. Роль этих белков заключается в связывании переносимого вещества и последующей передаче его собственно транспортирующей системе цитоплазматической мембраны. Специфичность системы определяется как связывающими белками, так и мембраносвязанными компонентами. Цитоплазматический мембранный компонент содержит три субъединицы, две из которых являются трансмембранными белками, а третья, по всей вероятности, прочно связана с цитоплазматической стороной мембраны. Как оказалось, этот третий компонент транспортного комплекса содержит место связывания нуклеотидов, где, как предполагается, происходит гидролиз АТФ — реакция, являющаяся движущей силой активного транспорта. Однако прямые данные, подтверждающие эту гипотезу, отсутствуют. Практически ничего не известно о механизме транспорта, за исключением того, что для него необходим растворимый связывающий белок.

По всей вероятности, эта система аналогична транспортной системе млекопитающих, которая используется ими для выведения из клетки нежелательных лекарственных веществ и обеспечивает множественную лекарственную устойчивость [30, 1272, 508]. По-видимому, транспорт разных лекарственных веществ единственной транспортной системой опосредуется группой немембранных связывающих белков. Сходное предположение высказывалось относительно кодируемой плазмидой бактериальной транспортной системы, которая выводит из клеток арсенаты [203]. Предполагается, что эти системы также используют гидролиз АТФ в качестве источника энергии, однако это не было прямо продемонстрировано.

3. **Вакуолярные H^+ -АТРазы** [1134, 128]. В эукариотических клетках имеются H^+ -АТРазы, локализованные в мембранах различных внутренних органелл (кроме митохондрий) (см. табл. 8.3). Эти АТРазы отличаются от АТРаз как F_1F_0 -, так и E_1E_2 -типов. В некоторых случаях функцией H^+ -АТРазы является транспорт протонов внутрь той или иной органеллы для закисления ее содержимого. Например, известно, что низкий рН в эндоцитозных пузырьках необходим для отсоединения лигандов от их рецепторов, происходящего вслед за эндоцитозом (гл. 9). Хотя достоверные данные о структурном родстве этих H^+ -АТРаз пока не получены, известно, что все они 1) содержат более одной субъединицы; 2) не образуют фосфорилированного интермедиата; 3) нечувствительны к ванадату; 4) транспортируют H^+ . Однако все эти вопросы требуют дополнительных биохимических и структурных исследований.

8.5. Активные транспортные системы, сопряженные с процессом переноса электронов или поглощением света

Имеется несколько интересных примеров активных транспортных систем, которые используют для своей работы изменение окислительно-восстановительного состояния связанный с белком простетической группы (например, гема) или энергию света, поглощаемого простетической группой (ретиналем). В целом транспорт и в этом случае подчиняется закономерностям, обсуждавшимся ранее. Для его осуществления нужно стабилизировать некую нестабильную форму белка, которая является необходимым промежуточным соединением в транспортном цикле. Способы стабилизации могут быть различными: фосфорилирование белка или даже связывание АТР, о чем мы уже говорили. В этом разделе мы остановимся на двух других способах.

8.5.1. ЦИТОХРОМ c -ОКСИДАЗА: ПРОТОННЫЙ РЕДОКС-НАСОС [502]

Этот белок является наиболее ярким примером фермента, который, функционируя как ионный насос, сопрягает ионный транспорт (H^+) и реакции переноса электронов. Оксидоза катализирует окисление цитохрома c , локализованного в межмембранном пространстве митохондрий, и восстановление O_2 до воды. В этой реакции участвуют четыре иона H^+ на каждую молекулу O_2 ; протоны поступают из матрикса митохондрий. Соответственно на каждый электрон, проходящий через систему, через внутреннюю митохондриальную мембрану переносится по меньшей мере один протон

[78]. Фермент содержит две простетические группы гема a , а также два или три атома меди и один атом цинка [1384]. Цитохром c -оксидаза — очень консервативный фермент, мало изменившийся в ходе эволюции. Ферменты, сходные с митохондриальной цитохром c -оксидазой, обнаруживаются во многих бактериях. Субъединичный состав комплекса сильно варьирует: он содержит от двух субъединиц у некоторых бактерий до 12 в оксидазе митохондрий сердца быка. По всей вероятности, в переносе H^+ непосредственно участвует одна субъединица (III), но окончательно этот вопрос еще не выяснен [1183]. Согласно данным электронной микроскопии, оксидоза не только пронизывает бислой, но и выходит на внешнюю поверхность мембраны. К сожалению, до сих пор окончательно не установлен не только механизм ионного транспорта, но и расположение простетических групп в ферменте.

Для описания работы оксидазы можно использовать очень простую модель четырех состояний [105]. В этой модели постулируется, что место связывания H^+ доступно с одной стороны мембраны, когда ион металла в составе простетической группы восстановлен, и обращено к противоположной стороне мембраны, когда он окислен. Значения pK (т. е. константы связывания H^+) в окисленном и восстановленном состояниях также могут различаться. Существенно, что в ходе реакций переноса электронов происходит поочередная стабилизация двух конформаций фермента, в которых место связывания H^+ обращено к разным сторонам мембраны. Однако механизм этого явления на молекулярном уровне не установлен.

В заключение следует отметить, что существует по меньшей мере один пример редокс-зависимого транспорта Na^+ [1473]. Это означает, что такого рода системы не ограничиваются переносом только ионов H^+ .

8.5.2. БАКТЕРИОРОДОПСИН: H^+ -НАСОС, ИСПОЛЬЗУЮЩИЙ ЭНЕРГИЮ СВЕТА

Структура бактериородопсина подробно обсуждалась в гл. 3. Функция этого белка состоит в активном транспорте протонов через бактериальную цитоплазматическую мембрану. Поглощение света связанной простетической группой ретиналя запускает последовательность событий, которые поддаются регистрации оптическими методами. Эти реакции сопряжены с переносом двух H^+ на каждый цикл работы комплекса [781]. Галородопсин, белок из той же бактерии, использует аналогичный механизм для активного транспорта Cl^- [819]. По всей вероятности, мономерная форма бактериородопсина является самостоятельной функциональной единицей, хотя внутри мембраны он находится в виде тримера. Показано, что ретиналь локализован примерно в середине бислоя. Пред-

полагается, что для него характерен прямой механизм сопряжения [578]. Структура белка с семью параллельными α -спиралями, пронизывающими мембрану, не дает ответа на вопрос о существовании какого бы то ни было канала. Как ион H^+ достигает ретиналя — неизвестно, но, без сомнения, это один из вопросов, который можно будет решить, используя методы сайт-специфического мутагенеза.

В лаборатории Кораны при помощи сайт-специфического мутагенеза были получены многочисленные мутантные формы бактериородопсина [1002, 570]. Оказалось, что большинство из них, в том числе и с замещением каждого из 11 остатков тирозина, сохраняют нормальную или близкую к нормальной транспортную активность [1002]. Эти данные служат еще одной иллюстрацией использования генетических методов исследования структуры и механизма действия белкового комплекса.

8.6. Мембранные поры, создаваемые экзогенными агентами

В предыдущих разделах мы рассматривали процессы регуляции клеткой потоков веществ через мембрану при помощи различных эндогенных транспортных систем. Однако в условиях *in vivo* поры в биомембранах могут образовываться с помощью экзогенных веществ, а также под влиянием различных воздействий. Многие пептиды (такие, как грамицидин А и мелиттин) и белки, создавая неселективные поры в плазматической мембране клетки-мишени, убивают клетку [92]. В этом разделе мы рассмотрим разные способы образования пор в биомембранах под действием специфических агентов или физических факторов.

8.6.1. ТОКСИНЫ И ЦИТОЛИТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

В природе существуют различные водорастворимые токсины, взаимодействующие со специфическими клетками-мишенями. Как минимум, токсины должны узнавать определенные рецепторы на наружной поверхности мембраны и каким-то образом проникать в цитоплазму. Одни токсины способствуют высвобождению в цитоплазму фермента, оказывающего летальное воздействие (например, дифтерийный токсин), другие просто образуют в мембране неселективные поры, давая возможность метаболитам, ионам, а иногда и макромолекулам выйти из клетки. Наиболее интересным представляется вопрос о том, как эти водорастворимые гидрофильные белки спонтанно встраиваются в мембранный бислой. Этот вопрос будет обсуждаться в разд. 10.3.1 при рассмотрении процессов транспорта белков из клетки.

Рассмотрим основные свойства некоторых из токсинов, образующих поры в биомембранах.

1. *Колицины* [235, 1061] представляют собой одиночные полипептиды (60 000 Да), и некоторые из них образуют неселективные каналы в цитоплазматической мембране чувствительных штаммов *E. coli*. Наиболее полно к настоящему времени охарактеризованы колицины E1 и A. Очищенные белки спонтанно формируют в плоских мембранах потенциалзависимые каналы, достаточно большие, чтобы пропускать такие молекулы, как NAD^+ . Недавно был выделен и охарактеризован каналобразующий участок, находящийся на С-конце колицина E1 (146 аминокислот; [1203, 1146]). Его аминокислотная последовательность отлична от таковой у интегральных мембранных белков. Под действием напряжения происходит переход образуемой колицином E1 поры из открытого состояния в закрытое, что сопровождается переносом через мембрану значительного количества белка [1203]. Пору образует только одна молекула колицина [1203, 1146].

2. *Дифтерийный токсин* [1061] представляет собой одиночный полипептид, также продуцируемый бактериями, который при связывании с поверхностными рецепторами определенных клеток образует в мембране канал и высвобождает в цитоплазму фермент, оказывающий летальное действие. Один фрагмент токсина формирует в мембране поры, размер которых достаточно велик, чтобы через них мог пройти сегмент токсина, обладающий ферментативной активностью [638]. Однако окончательно не доказано, что именно таков механизм переноса. Сходные результаты были получены и для токсинов, вызывающих столбняк и ботулизм [638]. Холерный токсин состоит из двух субъединиц, при этом субъединица В образует в мембране олигомер с центральным каналом, который используется для переноса А-субъединицы, обладающей ферментативной активностью [883]. С помощью рентгеновской кристаллографии была установлена структура экзотоксина А из *Pseudomonas*, близкого по строению к дифтерийному токсину [22], что, однако, не помогло выяснить механизм спонтанного встраивания этого растворимого белка в мембрану и образования поры.

3. *Комплекс комплемента и порообразующих белков из цитотоксичных Т-клеток (перфорин)*. Эти родственные белки сыворотки агрегируют, образуя большие поры (внутренний диаметр от 100 до 160 Å) в мембране клеток-мишеней [1624, 1341]. Первичным компонентом этого комплекса является белок C9, который после нескольких актов самосборки с участием других компонентов системы комплемента формирует большую пору, в результате чего происходит лизис клетки. Этот белок интенсивно изучали с использованием модельных систем плоских мембран и липосом [1341, 88]. Однако механизм формирования поры на молекулярном уровне до сих пор неизвестен.

Примером другого токсина, который агрегирует в мембране, образуя большую пору, является α -токсин из *S. aureus*. Известно, что он образует гексамерную структуру, претерпевающую при связывании с мембраной конформационные изменения [676].

8.6.2. ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ ПРИ ПОМОЩИ ДЕТЕРГЕНТОВ

Сапонин и дигитонин взаимодействуют с холестерином внутри мембран и образуют агрегаты в виде крупных пор [991]. Эти агенты широко используются для формирования больших отверстий в плазматических мембранах клеток, через которые внутрь клеток могут проходить как небольшие молекулы, так и макромолекулы (например, антитела) [991, 516, 820].

8.6.3. ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ ПРИ ПОМОЩИ ОСМОТИЧЕСКОГО ШОКА

Под действием осмотического шока в мембранах образуются отверстия. Так, в мембране эритроцита появляется одно большое отверстие диаметром ~ 1 мкм, размер которого затем уменьшается до $14 \div 280$ Å [857]. Конечный размер зависит от состава буфера. Детали формирования и строения этого гемолитического отверстия неизвестны.

8.6.4. ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Поры в плазматической мембране животных клеток могут образовываться и под действием электрического поля. Исследования, проведенные на телях эритроцитов, показали, что вблизи катода происходит формирование нестабильных больших пор (диаметр 168 Å), которые затем быстро уменьшаются до 10 Å [1364]. Образование пор под действием электрического поля иногда используют для инициации слияния клеток. Связано ли наблюдаемое порообразование со структурными изменениями, вызывающими слияние мембран, неизвестно.

8.6.5. ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ ЗА СЧЕТ ОБРАЗОВАНИЯ ДЕФЕКТОВ УПАКОВКИ МЕМБРАННЫХ КОМПОНЕНТОВ

Любая обработка, которая изменяет упаковку липидов и белков в мембране, может привести к нарушению функции мембраны как барьера для гидрофильных веществ. Например, проницаемость липосом при температуре фазового перехода существенно повышается, становясь эквивалентной проницаемости поры диаметром 18 Å

[1489]. К аналогичному эффекту может привести и агрегация белков как в реконструированных протеолипосомах, так и при перекрестном сшивании мембранных белков внутри биомембран [327, 1488]. Эти явления вряд ли участвуют в естественных физиологических процессах, однако они указывают на то, что какие-то изменения в организации мембранных компонентов несовместимы с функцией мембраны.

8.7. Резюме

Транспорт большинства растворимых молекул через биологические мембраны опосредуется переносчиками или канальными белками. Каналы облегчают транспорт ионов через мембрану, и перенос через них осуществляется очень быстро (10^6 — 10^8 ион/с на один канальный белок). Такие высокие скорости транспорта ионов связаны с тем, что канальные белки не претерпевают конформационных изменений при переносе иона с одной стороны мембраны на другую. Столь быстрый транспорт ионов обуславливает такую высокую мембранную проводимость, что удастся измерить ионный ток через отдельный канал. В отличие от этого переносчики, которые участвуют в транспортном цикле, претерпевают конформационные изменения. При этом место связывания переносимого вещества бывает обращено сначала к одной, а затем к противоположной стороне мембраны. Как правило, опосредованный переносчиками транспорт веществ через мембрану происходит на несколько порядков медленнее, чем транспорт по каналам.

Пассивные переносчики просто облегчают диффузию веществ через мембрану, в то время как активные используют энергию для транспорта веществ против концентрационного градиента. Известны активные переносчики, сопрягающие транспорт вещества с переносом электронов, гидролизом АТФ или фосфоенолпирувата, поглощением света или совместным транспортом иона.

Существуют группы каналов и переносчиков, которые объединяют функционально различающиеся белки, имеющие сходное строение. Близость их аминокислотных последовательностей позволяет предположить, что, несмотря на различия в субстратной специфичности, каналы и переносчики одной группы могут функционировать по сходному механизму. По-видимому, белковые комплексы образуют в мембране пору, находящуюся в центре белкового кластера, который содержит несколько (от трех до восьми) копий одинаковых или близкородственных полипептидов или доменов одного полипептида. Эти поры могут открываться или закрываться в ответ на химический или электрический сигнал.

КЛЕТОЧНАЯ ПОВЕРХНОСТЬ: РЕЦЕПТОРЫ, РЕЦИКЛИРОВАНИЕ МЕМБРАН И ПЕРЕДАЧА СИГНАЛОВ

9.1. Введение

Эта глава посвящена в основном переносу информации через мембранный барьер, тогда как в предыдущей главе рассматривался транспорт веществ. Все клетки должны иметь механизмы, позволяющие им контролировать состояние окружающей среды и отвечать на происходящие в ней изменения. В плазматических мембранах бактериальных, растительных и животных клеток содержится множество специализированных рецепторных молекул, которые, взаимодействуя с внеклеточными компонентами, вызывают специфические клеточные ответы. Одни рецепторы связывают питательные вещества или метаболиты, другие — гормоны или нейромедиаторы, третьи участвуют в межклеточном узнавании и адгезии или связывании клеток с нерастворимыми компонентами внеклеточной среды. Работа большинства рецепторных систем включает следующие стадии: 1) связывание лиганда или агониста с рецептором, расположенным на клеточной поверхности; 2) передачу внутрь клетки информации о связывании вещества с рецептором; 3) клеточный ответ, который в свою очередь делится на первичный и вторичный. Эта бурно развивающаяся область исследований благодаря применению молекулярно-биологических подходов имеет блестящие перспективы. Становится ясно, что многочисленные, на первый взгляд не связанные друг с другом рецепторные системы имеют в своей основе много общего. Идентифицировано несколько семейств рецепторных белков с гомологичными первичными структурами; каждый белок связывается с характерным для него лигандом, что вызывает специфический клеточный ответ. Такие «суперсемейства» состоят из структурно родственных, но функционально различающихся белков (табл. 9.1). Это предполагает наличие неких модульных конструкций не только среди рецепторных белков в пределах данного семейства [984], но также среди других компонентов рецепторных систем, так что варианты одной и той же основной структуры рецепторного белка могут удовлетворять разнообразные потребности различных типов клеток, взаимодействующих с разными эффекторами. В частности, совершенно очевидна ключевая роль

Таблица 9.1. Некоторые суперсемейства структурно родственных рецепторов у эукариот¹⁾

- (1) *Иммуноглобулиновое суперсемейство* — множество разнообразных функций
 Т-клеточный рецептор (α , β -субъединицы)
 Главный комплекс гистосовместимости класса II (α , β -субъединицы)
 Антиген-3, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-3)
 CD2 (Т-клеточный LFA-2)
 IgA/IgM-рецептор
 Fc-рецептор IgG
 IgE-рецептор с высоким сродством (α -субъединица)
 Поверхностные иммуноглобулины (тяжелые, легкие цепи)
 N-CAM
 Гликопротеин, ассоциированный с миеломом
- (2) *Интегрины* — связывание с компонентами внеклеточного матрикса и белками адгезии
 Фибронектиновые рецепторы
 Витронектиновые рецепторы
 Гликопротеиновый комплекс тромбоцитов (IIb/IIIa)
 Лейкоцитарные белки адгезии (LFA-1, Mac1, p150/95)
 Очень поздние Т-клеточные антигены (семейство VLA)
- (3) *Рецепторы митогенов/факторов роста, обладающие тирозинки назной активностью* — стимуляция клеточного роста
 Рецептор фактора роста эпидермиса
 Рецептор фактора роста производных тромбоцитов (PDGF)
 Инсулиновый рецептор
 Рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-I) [1476]
 Рецептор фактора роста-1, стимулирующего образование колоний (CSF-1)
- (4) *Рецепторы нейромедиаторов/ионные каналы* — каналы, функционирующие как рецепторы
 Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR)
 Рецептор γ -аминомасляной кислоты (ГАМК)
 Глициновый рецептор
- (5) *Рецепторы, активирующие G-белки*
 β -Адренергические рецепторы (β_1 , β_2)
 α -Адренергические рецепторы (α_1 , α_2) [767]
 Опины (родопсин)
 Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (M1, M2)
 Рецепторы, ответственные за тип спаривания у дрожжей (α , a)²⁾ [624]
 Рецептор субстанции K²⁾ [935]
- (6) *Различные рецепторы*
 (А) Асиалогликопротеиновые рецепторы

Продолжение табл. 9.1

Лимфоцитарный UeE-рецептор с низким сродством (функция неизвестна)
(Б) Рецептор инсулиноподобного фактора роста-2 (IGF-2) [1017]
Катионезависимый рецептор маноно-6-фосфата
Катионзависимый рецептор маннозо-6-фосфата (виецитоплазматический домен) [274]

¹⁾Дополнительные ссылки см. в тексте.

²⁾Активация G-белков предполагается.

GTP-связывающих белков (G-белков) и продуктов распада фосфатидилинозитола в самых разных системах. В этой главе мы попытаемся изложить основные концепции, разработанные в этой области в последние годы.

Мы рассмотрим также тесно связанный с предыдущим вопрос о динамических свойствах самой клеточной поверхности, в частности поверхности животной клетки. В гл. 5 мы обсуждали проблему диффузии отдельных белковых и липидных молекул в плоскости мембраны, а теперь рассмотрим динамическое равновесие между плазматической мембраной животной клетки и пулом внутриклеточных мембранных везикул, называемых эндосомами или рецептосомами, которые отшнуровываются от плазматической мембраны и способны опять с ней сливаться. Все это является частью сложного механизма внутриклеточного мембранного транспорта, протекающего также с участием других клеточных мембранных органелл, например комплекса Гольджи и лизосом. При поступлении соответствующих сигналов специфические белки плазматической мембраны, никапсулированные во внутреннем мембранном пуле, быстро высвобождаются и оказываются на поверхности мембраны в активной форме (примером может служить поведение переносчика глюкозы в ответ на инсулин [712]). Некоторые макромолекулы, например липопротеины низкой плотности (ЛНП), поглощаются клетками путем захвата отшнуровывающихся от плазматической мембраны везикул в процессе, называемом рецепторзависимым эндоцитозом. В следующей главе мы увидим, что новосинтезированные белки плазматической мембраны, а также секретируемые белки «путешествуют» от места их синтеза в эндоплазматическом ретикулуме до места назначения с помощью специальной мембранной транспортной системы при участии внутриклеточных везикул. Это явление называется экзоцитозом (разд. 10.2).

9.2. Поверхность животной клетки

Прежде чем переходить к обсуждению структур различных мембраносвязанных рецепторов и механизмов индукции клеточного ответа, полезно рассмотреть строение поверхности животной клетки, поскольку большинство исследований в этой области выполнено на клетках животных. Плазматическую мембрану отличают от других клеточных мембран две особенности.

1. Относительно высокое содержание холестерина (табл. 1.3). Оценить долю холестерина клетки, находящуюся в плазматической мембране, довольно трудно [1493], но ясно, что она весьма существенна. Высоким содержанием холестерина отличаются и другие мембранные структуры эндоцитозного пути (лизосомы, эндосомы). Еще один липид, содержащийся в значительных количествах в этих мембранах, — сфингомиелин.

2. Относительно высокое содержание гликопроизводных (гликолипидов и гликопротеинов). Гликопроизводные содержатся не только в плазматической мембране. Однако они присутствуют в ней в большом количестве. Все углеводные группы гликопротеинов плазматической мембраны находятся на наружной поверхности клетки, и, как указывалось в гл. 4, зная места их прикрепления, можно определить аминокислотные остатки мембранных белков, обращенные наружу. Большинство (но не все) белков плазматической мембраны гликозилированы. Полезно также помнить, что некоторые белки плазматической мембраны прикрепляются к ней с помощью фосфоинозитола и могут высвободиться под действием фосфолипазы C [675], а другие белки присоединяются через ковалентно связанные жирные кислоты (разд. 3.8).

Физико-химические свойства холестерина в составе модельных мембран широко исследовались (разд. 2.4.2), однако функциональная роль холестерина в плазматической мембране до сих пор неизвестна. Далека от выяснения и биологическая функция углеводных частей гликолипидов и гликопротеинов.

В качестве примера рассмотрим поверхность эритроцита [1519]. Два преобладающих в этой мембране белка — белок полосы 3 и гликофорин А — являются достаточно хорошо охарактеризованными гликопротеинами. Около 75% всех моносахаридов клеточной поверхности входит в состав гликопротеинов, а остальные 25% содержатся в гликолипидах, которые состоят из простых глобозидов и длинноцепочечных полилактозаминцерамидов (структурные данные см. в гл. 1). Эти гликолипиды составляют лишь несколько молярных процентов от общего количества липидов. Основные углеводсодержащие компоненты мембраны эритроцитов схематически представлены на рис. 9.1; указана максимальная протяженность углеводных цепей. Рис. 9.2 иллюстрирует поверхность эритроцита

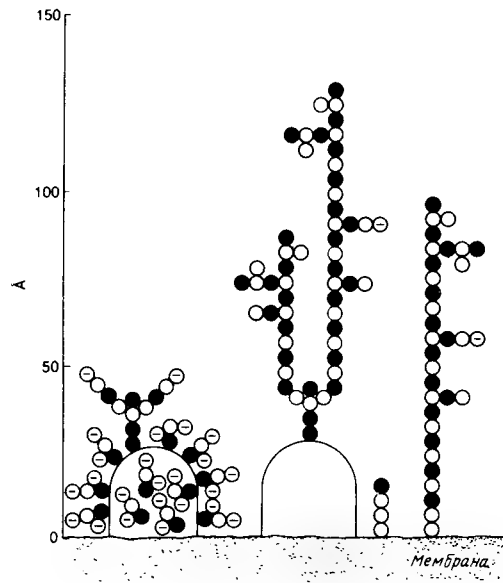


Рис. 9.1. Схематическое изображение различных гликопроизводных на поверхности эритроцита [1519]. Слева направо: гликофорин А (см. рис. 3.17), белок полосы 3, глобозид, полилактозаминцерамид. Светлые кружки обозначают гексозу, темные — N-ацетилгексозамины, кружки со знаком минус — остатки сиаловой кислоты.

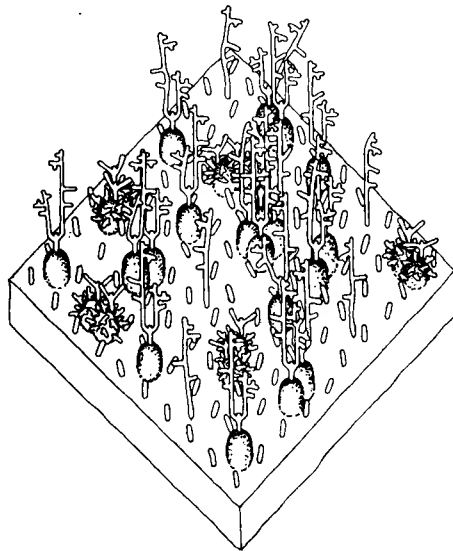


Рис. 9.2. Участок поверхности эритроцита размером $350 \times 350 \text{ Å}$ [1519].

в истинном масштабе, дающем представление о расстоянии между различными гликопроизводными. На самом деле углеводные цепи не выступают над клеточной поверхностью так, как это изображено на рис. 9.1 и 9.2 [539, 891], однако эти структуры, вероятно, играют важную роль при взаимодействии клеток с их окружением.

Углеводсодержащие соединения придают клеточной поверхности ярко выраженный гидрофильный характер. При этом отрицательный заряд в значительной степени определяется остатками сиаловых кислот, которые составляют семейство производных нейраминной кислоты (см. рис. 1.14). В некоторых случаях сиаловые кислоты маскируют специфические сайты узнавания на молекулах клеточной поверхности [1290]. Существенно, что гликопроизводные определяют свойства участка, выступающего над клеточной поверхностью на $\sim 100 \text{ Å}$. Кроме того, эти специфические компоненты обладают уникальными биологическими функциями.

Так, было показано, что углеводные компоненты гликолипидов и гликопротеинов изменяются при развитии и дифференцировке клетки и могут служить антигенными маркерами, ассоциированными с опухолями [415]. Ганглиозиды, представляющие собой содержащие сиаловую кислоту гликосфинголипиды (рис. 1.14), служат местом связывания холерного и столбнячного токсинов (GM_1) [434, 481]. Что еще более интересно — ганглиозиды непосредственно участвуют в регуляции процессов клеточного роста [1367, 143] и дифференцировки [1078], а также, по-видимому, воздействуют на фосфорилирование рецептора фактора роста эпидермиса (ФРЭ) — возможно, путем прямого взаимодействия [143]. При этом роль углеводного компонента гликопротеинов, и особенно рецепторных белков, не совсем ясна. Как показано в следующем разделе, гликозилирование может играть модулирующую или регуляторную роль при функционировании некоторых рецепторов, необходимых для межклеточной адгезии.

9.3. Рецепторы, определяющие клеточную адгезию

Один из основных классов рецепторов клеточной поверхности участвует в клеточной адгезии. Этот класс включает рецепторы, которые необходимы для узнавания клетками друг друга и для их адгезии, а также рецепторы, ответственные за связывание клеток с нерастворимыми компонентами внеклеточного матрикса, такими, как фибронектин или коллаген у животных. За связывание ответственны взаимодействия как между белками, так и между белками и сахарами. Способность клеток к специфическому взаимному узнаванию и адгезии крайне важна для эмбрионального развития; выявлены некоторые компоненты клеточной поверхности, необходимые для этого. У взрослого животного адгезивные взаимодействия

«клетка — клетка» и «клетка — матрикс» продолжают оставаться существенными для поддержания стабильности тканей. Те специфические системы, которые удалось исследовать, включают межклеточное узнавание при иммунном ответе, при миграции лимфоцитов к местам их назначения и при индукции адгезивных свойств у тромбоцитов при свертывании крови. Большую роль в исследовании этих систем сыграло использование методов молекулярной биологии, выявившее структурные взаимосвязи между рецепторами. Рассмотрим некоторые из рецепторов адгезии.

9.3.1. СВЯЗЫВАНИЕ БАКТЕРИЙ С ГЛИКОЛИПИДАМИ

Множество бактерий образуют колонии на твердых субстратах, а в некоторых случаях прилипают к специфическим поверхностям. Из бактериальных структур, участвующих в этом процессе, лучше всего охарактеризованы ворсинки [1330]. Это длинные нитевидные отростки, не имеющие аналогов среди высших организмов. Примером могут служить ворсинки, обнаруженные у патогенных штаммов *E. coli*, которые вызывают инфекционные заболевания мочевых путей человека [860]. Ворсинка содержит ~1000 белковых молекул, образующих спираль, на конце которой находится рецепторный белок (адгезин), специфически связывающийся с дигалактозидсодержащими гликолипидами. Эти липиды присутствуют на поверхности эпителиальных клеток, выстилающих мочевые пути, где и размножаются бактерии. Заметим, что необходимым условием выполнения адгезином его функций является локализация этого белка на значительном расстоянии от клеточной поверхности, обычно покрытой липополисахаридами (рис. 4.6.). Адгезин функционирует как лектин, т. е. сахаросвязывающий белок.

9.3.2. «ХОМИНГ» ЛИМФОЦИТОВ: СТЕЛОВЫМ КРОВЕТВОРНЫМ КЛЕТКАМ ТОЖЕ НУЖНЫ ГЛИКОПРОИЗВОДНЫЕ

Лимфоциты непрерывно циркулируют между кровью и лимфоидными органами (такими, как селезенка, аденоиды, миндалины). Именно в этих органах концентрируется антиген из всех межклеточных пространств, подвергается процессингу и становится доступным для антигенспецифичных лимфоцитов, вызывая иммунный ответ. Лимфоциты мигрируют между кровотоком и лимфоидными органами по лимфатическим сосудам, и из всех клеток крови только рециркулирующие Т- и В-лимфоциты прилипают к внутренним поверхностям стенок этих сосудов и затем мигрируют к лимфоидным органам. Такая миграция называется «хомингом», и для этого необходимы специфические рецепторы на клеточной поверхности

[484, 1339]. Хоминг-рецептор — это белок с мол. массой ~90 кДа, который ковалентно присоединен к убиквитину. Убиквитин представляет собой низкомолекулярный полипептид (8.451 кДа), ковалентно связанный с многочисленными цитоплазматическими белками и участвующий во внутриклеточной деградации белков [1339]. Роль убиквитина, присоединенного к вицитоплазматическому домену этого рецептора клеточной поверхности, неизвестна. Вероятно, однако, что подобным образом модифицируются и другие белки клеточной поверхности, поэтому такой механизм может иметь большое значение [1339].

Хоминг-рецептор, по-видимому, является также лектином, который узнает углеводную часть гликоосоединений на поверхности эндотелиальных клеток [484]. В этом процессе участвует маннозо-6-фосфат.

Стеловые кроветворные клетки тоже способны к хомингу [8]. Эти клетки, дифференцирующиеся в макрофаги и в клетки других типов, обладают сродством к клеткам стромы костного мозга и селезенки. Именно здесь происходит пролиферация и дифференцировка этих клеток. Хотя соответствующий рецептор и не был выделен, можно предположить, что он узнает галактозные и маннозные остатки гликопроизводных в тканях-мишенях. Поэтому взаимодействия белок/сахар важны для адгезии.

9.3.3. МОЛЕКУЛЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ [268, 270]

Для идентификации белков клеточной поверхности, участвующих во взаимодействиях между клетками, с успехом использовались моноклональные антитела. Соответствующие белки были названы молекулами клеточной адгезии, или CAM (от англ. cell adhesion molecules). Наиболее полно охарактеризовано семейство гликопротеинов, участвующих в адгезии нейронов (N-CAM). Сходные молекулы были обнаружены в мозгу мыши, цыпленка и человека. Во время развития отдельного организма N-CAM экспрессируются в нескольких формах в разное время в различных тканях. Не исключено, что сложная картина адгезии нейронов во время развития мозга обусловлена дифференциальной экспрессией и посттрансляционными модификациями небольшого числа молекул (CAM), а не участием большого количества высокоспецифичных белков адгезии. N-CAM являются гомофильными соединениями, т. е. молекула N-CAM одной клетки связывается со сходной молекулой другой клетки. Хотя эти белки адгезии гликозилированы, углеводы не являются необходимыми для взаимодействия, приводящего к связыванию. Однако гликозилирование может влиять на взаимодействие;

так, при переходе от эмбрионального мозга к мозгу взрослого организма число остатков сиаловой кислоты в N-CAM уменьшается в три раза, что коррелирует с увеличением адгезивности. Возможно, гликозирование играет регуляторную роль [1412].

Другие посттрансляционные модификации N-CAM включают фосфорилирование сериновых и треониновых остатков в цитоплазматическом домене, ацилирование жирных кислот и сульфирование N-концевых олигосахаридов. Возможно, все эти модификации являются способами регуляции биологических функций N-CAM. Кроме того, из-за альтернативного сплайсинга мРНК N-CAM продуцируются в трех разных формах (180, 140 и 120 кДа). Эти варианты N-CAM экспрессируются в разное время и в различных местах. Два из них предположительно содержат гидрофобную спираль, погруженную в мембрану, и протяженные С-концевые домены на цитоплазматической стороне мембраны. Эти две формы отличаются наличием в цитоплазматическом домене участка длиной 261 аминокислотный остаток. У третьей формы гидрофобный домен отсутствует, и, по-видимому, этот белок связывается с наружной поверхностью мембраны с помощью фосфоинозитольного мостика (разд. 3.8). Специфические биологические функции разновидностей N-CAM неизвестны.

Анализ аминокислотной последовательности N-CAM, проведенный с помощью кДНК, показал, что N-CAM относится к иммуноглобулиновому суперсемейству. N-CAM содержат пять смежных доменов протяженностью ~ 100 аминокислотных остатков каждый, которые гомологичны не только друг другу, но и иммуноглобулинам. Следовательно, N-CAM состоят из иммуноглобулиноподобных доменов и филогенетически родственны иммуноглобулинам. Это суперсемейство [665] включает также другие белки клеточной поверхности, которые функционируют как рецепторы, в том числе Т-клеточный рецептор и главные комплексы гистосовместимости МНС (рис. 9.3). В него входит также миелинсвязанный гликопротеин [810], который, вероятно, участвует во взаимодействии между аксонами и миелинизированными клетками периферической нервной системы. По своей структуре он весьма сходен с N-CAM, что предполагает наличие общей структурной основы у представителей одного класса молекул клеточной адгезии.

Основную роль в функционировании N-CAM играют гомофильные белок-белковые взаимодействия между иммуноглобулиноподобными доменами. Однако N-CAM связывается также с гепарином с помощью домена, расположенного вблизи N-конца [233], и это взаимодействие может играть роль в межклеточных контактах [232]. Таким образом, N-CAM полифункционален. На рис. 9.4 схематически представлена структура N-CAM [434], построенная по результатам исследований с использованием моноклональных анти-

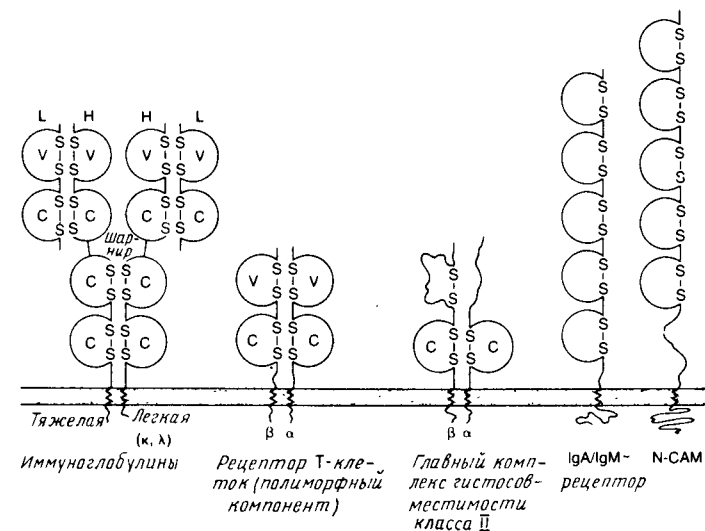


Рис. 9.3. Доменная структура нескольких представителей суперсемейства иммуноглобулинов [665]. С и V — константные и переменные домены иммуноглобулина. Во всех случаях С-коцы обращены в цитоплазму.

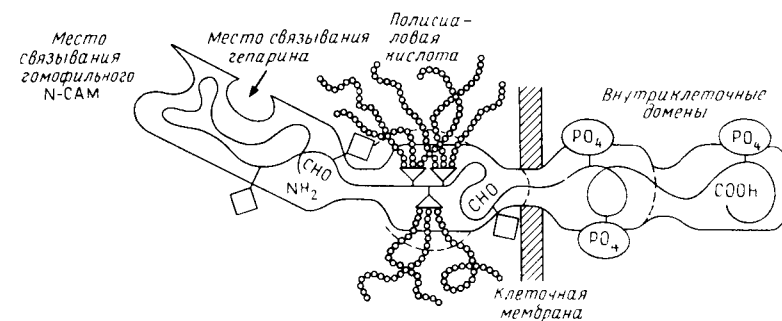


Рис. 9.4. Схематическое изображение N-CAM [464]. С помощью пунктирных линий указаны три формы N-CAM, которые различаются своими С-концевыми цитоплазматическими частями. Указано также уменьшение содержания полисиаловой кислоты у взрослой формы N-CAM. Ромбиками обозначены места гликозилирования (CHO). Действительный характер укладки полипептидной цепи неизвестен.

тел. Идентифицированы и другие виды САМ, отличные от N-САМ. Один из них, нейроглиальный, или Ng-САМ, выделен из эмбриона цыпленка. N-САМ участвует в адгезии нервных клеток (гомотипическое связывание), а Ng-САМ — нервных клеток и клеток глии (гетеротипическое связывание). Время появления и клеточная локализация Ng-САМ отличны от таковых у N-САМ [1446]. Возможно, запрограммированное появление Ng-САМ вместе с N-САМ помогает в регуляции образования нервной сети. Взаимодействия, в которых участвуют эти САМ, не зависят от ионов кальция.

Обнаружен отдельный класс белков САМ, которые опосредуют Ca^{2+} -зависимые межклеточные взаимодействия [1081, 1220]. Эти белки были названы кадхеринами [1081] и включают в себя эпителиальный (Е) кадхерин [1335], плацентарный (Р) кадхерин [1081] и увоморулин [1220] мышей. Гомолог Е-кадхерина цыпленка называется L-САМ [485]; оба этих гликопротеина опосредуют взаимодействия между эпителиальными клетками. Сходство аминокислотных последовательностей Ca^{2+} -зависимых белков САМ свидетельствует о том, что они образуют отдельное суперсемейство молекул адгезии [1081, 1220]. Например, результаты определения полной аминокислотной последовательности L-САМ по данным секвенирования кДНК показывают, что его мол. масса составляет 79,7 кДа (без учета вклада гликозилирования), однако гомологу с белком N-САМ отсутствует и L-САМ не принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов. Тем не менее в молекуле САМ имеются три соседних гомологичных сегмента длиной по 113 аминокислотных остатков, а в молекуле N-САМ — пять таких сегментов, что указывает на сходство структурной организации упомянутых белков.

Дальнейшие исследования белков САМ прольют свет на механизмы межклеточного узнавания и адгезии во время эмбриогенеза и множества других клеточных процессов.

9.3.4. РЕЦЕПТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ ПРИ ИММУННОМ ОТВЕТЕ [963, 732, 647, 924]

При исследовании САМ выявился один неожиданный факт: в межклеточных взаимодействиях при эмбриогенезе участвует относительно небольшое число структурно различающихся САМ, а для взаимодействий между лимфоцитами, опосредующими иммунный ответ, наблюдается обратная картина. В индукции антител, направленных против специфического антигена, участвуют по крайней мере три разных типа клеток: 1) В-клетки, которые продуцируют антитела; 2) Т-клетки (хелперы), которые секретируют факторы роста; 3) макрофаги, или дополнительные (А) клетки. У каждой из

этих клеток имеются поверхностные рецепторы, которые участвуют в специфических межклеточных взаимодействиях и в активации В-клеток с целью их дальнейшей пролиферации и секреции антител против специфического антигена. Известны два основных рецептора, участвующих в этом процессе: 1) Т-клеточный рецептор; 2) гликопротеины МНС класса II. Оба они входят в иммуноглобулиновое суперсемейство [665, 647] (рис. 9.3). Специфические межклеточные взаимодействия, участвующие в иммунном ответе, определяются в первую очередь белок-белковыми взаимодействиями между этими рецепторами клеточной поверхности. Приведем упрощенную последовательность событий.

1. Антиген захватывается А-клетками, подвергается процессингу и образует на клеточной поверхности комплекс с гликопротеинами МНС класса II.

2. Т-клетка взаимодействует с А-клеткой при участии Т-клеточного рецептора. Подразумевается, что Т-клеточный рецептор одновременно узнает гликопротеины МНС класса II и антиген. При этом с А-клеткой будут взаимодействовать только Т-клетки с подходящими антигенспецифичными рецепторами. В популяции Т-клеток существует много разнообразных структур Т-клеточных рецепторов, однако каждая отдельная клетка продуцирует только один из них. Результатом такого взаимодействия между А- и Т-клетками является, в частности, образование факторов роста, которые стимулируют пролиферацию субпопуляции Т-клеток, а также других лимфоидных клеток (В-клеток, цитотоксичных Т-лимфоцитов).

3. В-клетки могут экспрессировать большое число разных мембраносвязанных иммуноглобулинов (рис. 9.3), но, как и в случае Т-клеток, индивидуальная В-клетка экспрессирует лишь один тип иммуноглобулина. В-клетки данной субпопуляции будут нести поверхностные иммуноглобулины, связывающиеся со специфическим антигеном, представленным системе. Активность и пролиферация В-клеток усиливаются при их взаимодействии с активированными Т-клетками и факторами, которые этими клетками высвобождаются. По-видимому, взаимодействие включает узнавание Т-клеткой антигена, который связывается с гликопротеинами МНС класса II на поверхности В-клетки. Это явление известно как МНС-ограниченная иммунная реакция. Проллиферация активированных В-клеток приводит к образованию популяции клеток, секретирующих антигенспецифичное антитело.

Гликопротеины МНС класса II являются гетеродимерами, в которых каждая полипептидная цепь имеет единственный трансмембранный сегмент [732]. Обе цепи гликозилированы (тяжелая, или β -цепь, мол. масса ~33 кДа; легкая, или α -цепь, мол. масса ~27 кДа). Методом рентгеноструктурного анализа была установлена структура главной части гликопротеинов МНС класса II и лока-

лизован участок связывания с пептидными антигенами [104]. В работе [559] приводится информация о взаимодействии пептидных антигенов с гликопротеинами МНС класса II. Данные по передаче энергии электронного возбуждения свидетельствуют о том, что очищенные гликопротеины МНС класса II, встроенные в плоскую мембрану, образуют тройной комплекс с Т-клеткой (через Т-клеточный рецептор) и антигеном, что напоминает антигенспецифичное взаимодействие между В- и Т-клетками [1559]. Новые данные о взаимодействии между компонентами, участвующими в адгезии клеточных мембран, вероятно, позволят получить опыты с использованием искусственных мембран [947] (разд. 2.5.4).

Т-клеточный рецептор состоит из двух частей [924]. Антигенспецифичная часть (Ti) является $\alpha\beta$ -гетеродимером, который имеет моноклональную специфичность (как иммуноглобулины) и принадлежит к иммуноглобулиновому суперсемейству (рис. 9.3). Этот $\alpha\beta$ -димер образует в мембране комплекс со структурно инвариантным (мономорфным) компонентом. Данный комплекс охарактеризован для мышиных [1275] и человеческих [1567] Т-клеток; он состоит из четырех или пяти полипептидов. Вероятно, эта часть Т-клеточного рецептора участвует в передаче сигнала, приводящей к активации Т-клетки.

Гликопротеины МНС класса II, присутствующие на антигенпредставляющих клетках, могут взаимодействовать и с другим гликопротеиновым рецептором, находящимся на поверхности Т-клеток. Это рецептор CD4; его взаимодействие с гликопротеинами МНС класса II, возможно, облегчает межклеточное взаимодействие [345].

Существует и вторая пара рецепторов, участвующих в адгезии между антигенпредставляющей клеткой и Т-хелпером [142]. Т-лимфоциты содержат мембранный гликопротеин CD2, который специфически взаимодействует с другим белком адгезии, обозначаемым LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen-3), который присутствует в мембранах множества типов клеток [1316, 360]. Интересно, что как CD2 (обозначаемый также LFA-2), так и LFA-3 являются членами иммуноглобулинового суперсемейства и структурно родственны N-CAM (табл. 9.1). Как и N-CAM, рецептор LFA-3 существует в разных формах и может фиксироваться на мембране с помощью трансмембранной спирали или фосфатидилинозитоляного якоря [1316, 360]. Взаимодействие между рецепторами LFA-3 и CD2, по-видимому, существенно для активации Т-хелперов.

После активации Т-клеток происходит экспрессия рецептора для фактора роста Т-клеток — интерлейкина-2. Клонирован и секвенирован ген, кодирующий одну субъединицу этого рецептора [1535]; по-видимому, рецептор имеет единственный трансмембранный сегмент и лишь очень небольшой С-концевой цитоплазматический до-

мен. Это весьма необычно для митогенных рецепторов, которые, как правило, имеют протяженный цитоплазматический домен, обладающий тирозинспецифичной протеинкиназной активностью. Механизмы, с помощью которых животные клетки отвечают на митогены и другие стимулы, обсуждаются в разд. 9.7.

9.3.5. ИНТЕГРИНЫ — СЕМЕЙСТВО РЕЦЕПТОРОВ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С КОМПОНЕНТАМИ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И БЕЛКАМИ АДГЕЗИИ [672, 160, 1261]

Помимо суперсемейства иммуноглобулиновых рецепторов клеточной поверхности (рис. 9.3) идентифицировано и другое многочисленное семейство рецепторов клеточной адгезии, называемых интегринами. Интегрины участвуют в связывании с белками внеклеточного матрикса и другими белками адгезии. Во многих случаях интегрины узнают трипептид Arg-Gly-Asp (RGD, если использовать однобуквенное обозначение) и связываются с белками, содержащими его. Интегрины являются гетеродимерами, в которых каждая субъединица (α , β) предположительно содержит один трансмембранный сегмент вблизи С-конца (рис. 9.5). В каждой субъединице имеются короткий (~ 20 — 50 аминокислотных остатков) цитоплазматический домен и большой внеклеточный домен. Более крупная α -субъединица (~ 150 кДа) во многих случаях подвергается протеолитическому расщеплению с образованием двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидной связью. β -Субъединица (~ 110 кДа) содержит четыре повтора длиной 40 аминокислотных остатков каждый, богатых цистеином, которые содержат многочисленные внутрицепочечные дисульфидные связи. Обе субъединицы гликозилированы. Идентифицировано примерно 20 разных членов этого семейства рецепторов в разных типах клеток. О сходстве членов этого семейства свидетельствуют результаты перекрестного иммунохимического анализа и/или данные о гомологии

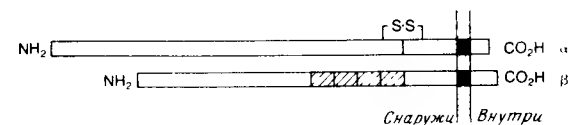


Рис. 9.5. Линейная схема доменной структуры α - и β -цепей интегрина [672]. Каждая субъединица имеет единственный трансмембранный сегмент, короткий цитоплазматический домен и протяженный N-концевой внецитоплазматический домен. β -Субъединица содержит четыре повтора богатого цистеином участка длиной 40 аминокислот (затрихованная область). Некоторые из α -субъединиц расщепляются после трансляции с образованием тяжелой и легкой цепей, связанных дисульфидными мостиками.

аминокислотной последовательности. Примеры интегринов приведены в табл. 9.1. Показано, что эти белки связываются с множеством матричных белков или белков адгезии, однако индивидуальные интегрины строго специфичны. Решающее значение для взаимодействия имеют трипептиды RGD, но для полного объяснения специфичности нужно привлекать и другие детерминанты.

Одна из важных функций интегринов состоит в передаче информации в клетку, поскольку связывание с белками внеклеточного матрикса часто играет большую роль в определении формы клетки и ее миграции и оказывается решающим для морфогенеза и дифференцировки [971]. Показано, что интегрин из фибробластов цыпленка связывается с компонентом цитоскелета талином. Это связывание конкурентно ингибируется пептидом, который соответствует сайту фосфорилирования тирозинкиназы, находящегося в цитоплазматическом домене β -субъединицы интегринна [160]. Этот пептид, однако, не влияет на связывание белков внеклеточного матрикса через сайт(ы) RGD, что свидетельствует о квазинеzáвисимости внутриклеточного (связывающегося с талином) и внеклеточного (связывающегося с RGD) доменов. Интегрин — это наиболее полно охарактеризованный трансмембранный белок, который одновременно взаимодействует с внеклеточными компонентами и цитоскелетом.

Одной интересной особенностью интегринов является наличие их разновидностей, содержащих одинаковые β -субъединицы, которые представлены по меньшей мере тремя типами (β_1 , β_2 , β_3). Однако четко разграничить функции α - и β -субъединиц, считая, что одни из них ответственны за связывание с внеклеточными элементами, а другие — с внутриклеточными, не удастся. Так, было показано, что способность интегринна цыпленка к связыванию полностью утрачивается при диссоциации субъединиц и восстанавливается при реконструкции гетеродимера [160].

Дополнение 9.1. Примеры некоторых интегринов

1. *Рецепторы для белков внеклеточного матрикса птиц и млекопитающих.* Они связываются с гликопротеиновыми компонентами внеклеточного матрикса, в частности с фибронектином, ламинином и витронектином. Связывание с рецепторами в большинстве случаев конкурентно блокируется пептидами, содержащими трипептид RGD. Было показано, что фибронектин опосредует клеточное движение, и ясно, что рецептор фибронектина и его внутриклеточные контакты имеют решающее значение для клеточного морфогенеза.

2. *Гликопротеины IIb/IIIa тромбоцитов.* IIb и IIIa являются гликопротеинами мембран тромбоцитов, гомологичными α - и β -субъединицам других интегринов. Этот поверхностный рецептор участвует в агрегации тромбоцитов, происходящей при свертывании крови. Тромбоциты не агрегируют до тех пор, пока не произойдет «активация» одним из агонистов — тромбином, коллагеном или адреналином. Процесс активации детально не изучен, но одним из ее результатов является увеличение доступности комплекса IIb/IIIa на поверхности тромбоцитов, в результате чего он может взаимодействовать с циркулирующими макромолекулярными «адгезивными» белками [1605, 236], в том числе с фибриногеном, фибронектином и фактором фон Виллебранда. Это связывание зависит от кальция. Фибриноген двухвалентен и, вероятно, более важен для связывания тромбоцитов в каскаде агрегации. Плазматический фактор фон Виллебранда является многофункциональным гликопротеином, который обладает сродством не только к активированному интегину, но и к коллагену. Следовательно, этот белок адгезии способствует прилипанию активированных тромбоцитов к сосудистому субэндотелию, который становится доступным для них при нарушении целостности эндотелиальных клеток после ранения [1244]. Фактор фон Виллебранда связывается также с другим рецепторным белком тромбоцитов, гликопротеином Ib [581].

3. *Лейкоцитарные белки адгезии.* Для того чтобы мигрировать к месту инфекции и воспаления, лейкоциты должны вступить во взаимодействие с эндотелиальными клетками сосудов. Идентифицированы три гетеродимерных рецептора, участвующие в адгезии лейкоцитов (табл. 9.1); все они относятся к семейству интегринов [759]. По-видимому, все три белка имеют одинаковые β -субъединицы. Один из них, LFA-1, связывается со специфическим гликопротеином клеточной поверхности ICAM-1, присутствующим на фибробластах. Это взаимодействие может опосредовать связывание Т-лимфоцитов с фибробластами при воспалении [923].

4. *Позиционно специфические антигены дрозофилы.* По-видимому, семейство рецепторов, необходимых для нормального эмбрионального морфогенеза дрозофилы, также принадлежит к семейству интегринов [160, 1051, 114]. В присутствии пептидов, содержащих последовательность RGD, происходит нарушение эмбриогенеза и блокируется гастрюляция у *Drosophila* [1051].

9.3.6. ДРУГИЕ СПОСОБЫ СВЯЗЫВАНИЯ С МАТРИКСОМ И БЕЛКАМИ АДГЕЗИИ

Интегрины не уникальны в своих свойствах, касающихся связывания с внеклеточным матриксом и белками адгезии. Показано, что ламинин, тромбоспондин и фактор фон Виллебранда специфически

связываются с гликолипидами, содержащими сульфогруппы [1226]. Физиологическое значение этого взаимодействия неясно. Фермент 5'-нуклеотидаза также участвует во взаимодействии как с внеклеточными, так и с внутриклеточными компонентами [332], хотя роль этого взаимодействия *in vivo* не доказана. Существуют также рецепторы ламинина, которые не относятся к семейству интегринов [537, 1355].

Всесторонне изучена агрегация диссоциированных клеток губки [1037]. Для инициации этого процесса должно произойти связывание некоего высокомолекулярного фактора с внеклеточным доменом рецептора агрегации, находящимся в плазматической мембране. Это, по-видимому, служит сигналом к запуску быстрого распада фосфатидилинозитола и образованию внутриклеточных вторых посредников (разд. 9.7.2), которые инициируют агрегацию, опосредованную фактором сборки коллагена. Коллагеновые тяжи служат матриксом, на котором сорбируются клетки губки.

9.4. Повторное использование (рециклирование) мембран и эндоцитоз с участием рецепторов [1584, 1447, 1024, 966, 651]

До сих пор мы считали мембрану животной клетки статичной структурой, состав которой изменяется только во время роста клетки или при дифференцировке. На самом деле клеточная поверхность чрезвычайно динамична и составляет вместе с клеточными мембранными органеллами часть сложной сети мембранного транспорта. Мембранный транспорт можно разделить на две составляющие: *эндоцитоз* и *экзоцитоз* (рис. 9.6). Эндоцитоз — это поглощение внеклеточной жидкости и частиц в составе мембранных пузырьков, а экзоцитоз включает процессинг новосинтезированных белков и липидов и их доставку к месту секреции или включения в плазматическую мембрану, лизосомы или вакуоли. В обеих системах происходит селективный перенос специфических мембранных компонентов между мембранами внутри клетки с помощью везикул, которые отщипываются от одной мембраны и сливаются с другой. Важнейшей особенностью регуляции этих процессов является закисление везикул и вакуолей с помощью H^+ -АТФаз (разд. 8.4.3) [966]. В этом разделе мы рассмотрим эндоцитозный путь, в особенности его связь с функцией рецепторов. В следующей главе будет обсуждаться экзоцитозный путь с точки зрения мембранного биогенеза

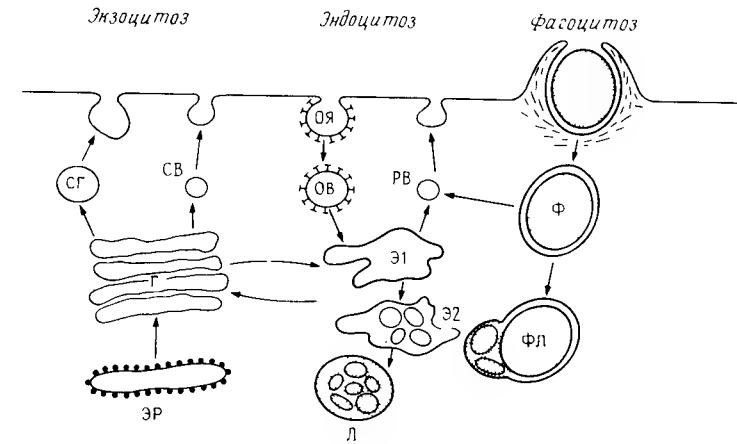


Рис. 9.6. Схематическое изображение мембранного транспорта между внутриклеточными вакуолями и плазматической мембраной [966]. ЭР — эндоплазматический ретикулум, СГ — секреторная гранула, СВ — секреторная везикула, Л — лизосома, Э1 — периферическая эндосома, Э2 — перинуклеарная эндосома, ОВ — окаймленная везикула, ОЯ — окаймленная ямка, РВ — рециклирующая везикула, ФЛ — фаголизосома, Ф — фагосома, Г — аппарат Гольджи. Экзоцитозный путь обсуждается в гл. 10.

(разд. 10.2). Вопросы слияния мембран и механизмы биологической регуляции этого процесса в общем виде рассматриваются в разд. 9.5.

9.4.1. ОБЩИЕ СВОЙСТВА ЭНДОЦИТОЗНОГО ПУТИ [966]

Разграничим процессы поглощения клеткой крупных частиц, растворенных веществ и жидкости. Поглощение крупных частиц называется *фагоцитозом* и характерно только для клеток некоторых типов (амебы, макрофаги). Процесс активируется частицами и чувствителен к цитохалазину. После образования промежуточной *фагосомы* везикула закисляется и затем сливается с лизосомой, содержащей ферменты деградации.

В основе поглощения жидкости (*пиноцитоза*) и опосредованного рецепторами поглощения растворенных веществ лежит образование окаймленных ямок и окаймленных везикул. Термин «окаймленные» относится к морфологии этих структур, выявляемой с помощью электронной микроскопии. Отличительной их особенностью является наличие решетчатой структуры из молекул белка клатрина, кото-

рый связывается с углублениями на поверхности плазматической мембраны (окаймленные ямки) и везикулами, образующимися из таких ямок (разд. 9.4.3). Возможно, существуют и другие эндоцитозные пути без участия окаймленных везикул, однако о них известно немного [1466]. Окаймленные везикулы участвуют и в экзоцитозе.

На долю окаймленных ямок обычно приходится всего 1 — 2% общей площади поверхности плазматической мембраны, и большинство белков плазматической мембраны не обнаруживаются на этих участках. Однако концентрация некоторых белков в этих ямках очень высока. Например, в них сосредоточено около 70% белка — рецептора липопротеина низкой плотности (ЛНП-рецептор). В некоторых случаях родство рецептора к окаймленным ямкам постоянно (например, ЛНП-рецептор), в других рецептор концентрируется в них только при связывании лиганда (например, рецептор фактора роста эпидермиса, ФРЭ-рецептор). В табл. 9.2 перечислены некоторые рецепторы плазматической мембраны, участвующие в поглощении специфических лигандов с помощью окаймленных ямок и везикул.

По-видимому, после образования эндоцитозных везикул оболочка из клатрина удаляется специфическим белком в ходе АТР-зависи-

Таблица 9.2. Некоторые рецепторы, интернализуемые при эндоцитозе

<i>Группа I.</i> Рецептор возвращается к клеточной поверхности, лиганд поступает в лизосомы	
	Рецептор маннозы
	Рецептор асиалогликопротеина (галактозы)
	Рецептор маннозо-6-фосфата
	Рецептор α_2 -макроглобулина
	Рецептор ЛНП
<i>Группа II.</i> Рецептор и лиганд поступают в лизосомы	
	Рецептор ФРЭ
	Инсулиновый рецептор
<i>Группа III.</i> Трансцитоз ¹⁾	
	IgA/IgM-рецептор
	IgG-рецептор
<i>Группа IV.</i> Рецептор и лиганд возвращаются к одному и тому же домену плазматической мембраны	
	Трансферриновый рецептор

¹⁾ При трансцитозе лиганд направляется через клетку от одного домена плазматической мембраны к другому (см. разд. 9.4.2).

мой реакции. Эти данные получены в экспериментах *in vitro*; роль указанного белка *in vivo* пока не выявлена. Везикулы без клатрина становятся частью сложной системы трубочек и везикул, называемых периферическими *эндосомами*; они локализованы вблизи плазматической мембраны. На основе функциональных и морфологических различий [651] субпопуляциям эндосом были присвоены различные названия [такие, как рецептосомы или CURL (compartment of uncupled receptor and ligand)]. Мы будем называть их просто эндосомами. Существует также система эндосом, локализованных вблизи центриолей и комплекса Гольджи; они называются перинуклеарными (околоядерными) эндосомами. Эти структуры почти наверняка также участвуют в эндоцитозном мембранном транспорте. Конечный пункт эндоцитозного пути находится во вторичных лизосомах, где происходит деградация отдельных растворенных веществ (таких, как липопротеины низкой плотности).

Скорость, с которой происходит рециклирование мембран, поистине удивительна. Ее можно определить с помощью водорастворимых, не проникающих в мембрану меток, оценивая скорость поглощения клеткой внеклеточной жидкости. К таким меткам относятся, например, радиоактивный инулин, декстран, краситель люцифер желтый [1287, 1415]. Измерения, проведенные на гепатоцитах с использованием инулина, показали, что эти клетки поглощают путем эндоцитоза за 1 ч количество жидкости, составляющее не менее 20% их объема, и количество мембранного материала, по площади превышающее в пять раз площадь их базолатеральной плазматической мембраны [1287]! Скорость эндоцитоза у других типов клеток не столь велика, но также впечатляет; например, макрофаги поглощают за 1 ч мембранный материал, площадь которого вдвое превышает площадь их поверхности, а адипоциты — материал, по площади составляющий 0,2 площади их поверхности. Большая часть жидкости, поглощаемой клетками, быстро выводится из них за характерное время от 1 мин (гепатоциты) до 20 мин (адипоциты). Возможно, между плазматической мембраной и периферическими эндосомами устанавливается динамическое равновесие, причем на долю эндосом приходится лишь около 3% общего объема клетки [1287]. Кроме того, некоторая часть инулина, поглощаемого гепатоцитами, поступает в гораздо медленнее обменивающийся внутренний пул (характерное время обмена ~1 ч), что, возможно, отражает попадание его в другие внутренние вакуоли, например в лизосомы.

Эти данные свидетельствуют об исключительной динамичности поверхности мембран. Бретчер [146] обратил внимание на то, что если бы какой-то участок плазматической мембраны включался в одном месте клеточной поверхности и появлялся в другом, то это означало бы, что существует односторонний мембранный по-

ток. Это представление было положено в основу модели, объясняющей механизм амeboидного движения клетки таким же образом, как и «кэпинг» поверхностного антигена [146]. Кэпинг наблюдается как у лимфоцитов, так и у других типов клеток; он инициируется агрегацией белков плазматической мембраны, обычно путем связывания мультвалентного лиганда (антитела) с каким-то компонентом клеточной поверхности. Связанный компонент агрегирует с образованием «очажков», которые затем объединяются в один крупный агрегат — кэп. Далее происходит поглощение белковых агрегатов. Было высказано предположение [146], что первые белковые агрегаты пассивно увлекаются предполагаемым массовым мембранным потоком, при этом они концентрируются около места интернализации. Альтернативная точка зрения, гораздо более распространенная, заключается в том, что кэпинг — это активный процесс, протекающий при прямом участии элементов цитоскелета [744]. Интересно отметить, что ганглиозиды также можно индуцировать для образования кэпа на лимфоцитах [1370].

9.4.2. СОРТИРОВКА КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕКСА РЕЦЕПТОР—ЛИГАНД

В результате эндоцитоза и быстрого рециклирования плазматической мембраны происходит поглощение не только жидкостей. Одна из основных функций этого процесса состоит в облегчении поглощения внеклеточных белков. Большинство рецепторов, перечисленных в табл. 9.2, которые концентрируются в окаймленных ямках, связываются с такими макромолекулярными лигандами, как гликопротеины, липопротеины низкой плотности или иммуноглобулины. Кроме того, имеются рецепторы для факторов роста и таких гормонов, как ФРЭ или инсулин, когда в результате рециклирования плазматическая мембрана быстро освобождается от комплексов гормон—рецептор, заменяемых новосинтезированными рецепторами. Структурные детерминанты, которые опосредуют связывание этих рецепторов с окаймленными ямками, неизвестны. Установлена первичная структура нескольких таких рецепторов, при этом никакого сходства между ними не выявлено. Все они имеют единственный трансмембранный сегмент, но у одних N-конец обращен в цитоплазму, а у других ориентирован в противоположном направлении. В нескольких случаях было показано, что цитоплазматический домен рецептора необходим для того, чтобы рецептор оставался в незамкнутых ямках, но об этом известно очень мало.

Судьбы рецептора и лиганда после их поглощения клеткой различаются. Исходя из этого можно выделить четыре основные группы систем лиганд—рецептор (табл. 9.2 и рис. 9.7).

Группа I. Рецептор возвращается к поверхности клетки, лиганд

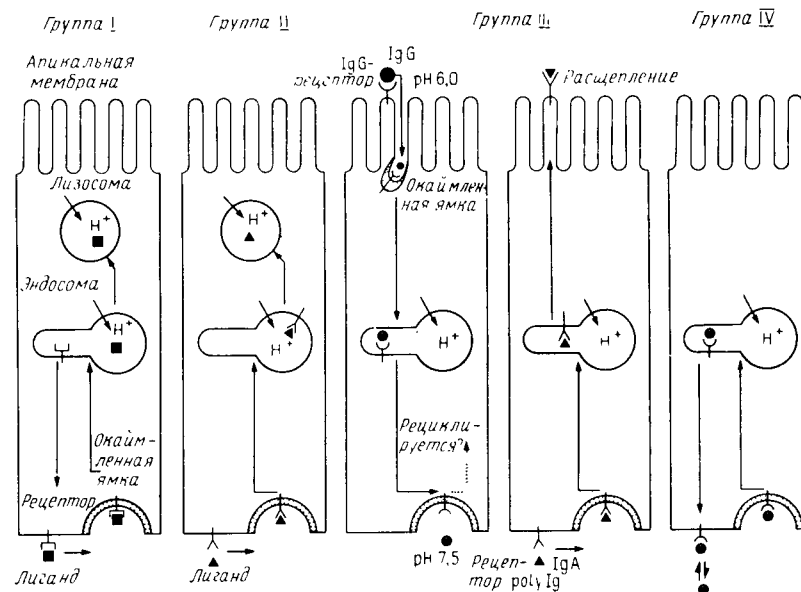


Рис. 9.7. Различные типы эндоцитозной сортировки [1024]. Группа I: рецептор рециклируется, лиганд разрушается (пример — рецептор ЛНП). Группа II: и рецептор, и лиганд разрушаются в лизосоме (пример — рецептор ФРЭ). Группа III: транзитоз (пример — IgA/IgM-рецептор и IgG-рецептор, соответствующие противоположным направлениям переноса лиганда). Группа IV: рецептор возвращает модифицированный лиганд обратно на клеточную поверхность (пример — ферритин, апоферритин).

направляется в лизосомы. Примерами служат ЛНП- и асиалогликопротеиновый рецепторы.

Группа II. Как рецептор, так и лиганд направляются в лизосомы. Примерами являются ФРЭ- и инсулиновый рецепторы.

Группа III. Рецептор остается связанным с лигандом, а лиганд направляется в другой домен плазматической мембраны. Это явление называется *транзитозом* [1024] и характерно для рецепторов иммуноглобулинов в поляризованных эпителиальных клетках. После такого клеточного «транзита» рецепторы для IgA и IgM подвергаются протеолитическому расщеплению, тогда как рецептор для IgG при некоторых условиях может использоваться вновь.

Группа IV. И рецептор, и лиганд возвращаются к одному и тому же домену плазматической мембраны. Наиболее полно охарактеризованным примером такого рода служит трансферриновая система, в которой после поглощения комплекса трансферрин—железо и удаления железа комплекс апотрансферрин—рецептор возвращается к клеточной поверхности.

Скорости всех этих процессов достаточно велики [1447]. Обычно время жизни рецепторов, возвращающихся к клеточной поверхности, составляет всего 3 — 6 мин, а время полного оборота рецептора — около 15 — 25 мин. В равновесном состоянии на клеточной поверхности обнаруживается около 65 — 75% рецепторов, а остальная их часть находится на разных внутриклеточных мембранах. Полный анализ равновесной кинетики поглощения и процессинга может быть проделан с привлечением констант скоростей для каждого элементарного шага [1045].

Одной из характерных особенностей механизма сортировки является его удивительная точность. Например, трансферриновый рецептор почти всегда находится в базолатеральной, но не в апикальной мембране поляризованных эпителиальных клеток. Вероятность его ошибочного включения в апикальную мембрану составляет лишь ~0,1%, т. е. достаточно мала для сохранения полярности мембран этих клеток [471]. В других системах, где по экспериментальным данным вероятность ошибки достигала 4%, для корректировки локализации рецепторов был необходим дополнительный этап сортировки.

Механизм сортировки должен быть весьма изощренным. По-видимому, различные комплексы рецептор—лиганд поглощаются вместе в одних и тех же частях окаймленных везикул, а сортировка внутри везикул происходит за несколько минут [1395]. Например, рецептор для асиалогликопротеинов перемещается в латеральном направлении внутри эндосомной системы и концентрируется в трубочках и маленьких везикулярных компонентах, но не в крупных везикулах [511]. Возможно, крупные эндосомные везикулы, практически лишенные этого рецептора, но содержащие гликопротеиновый лиганд, сливаются затем с лизосомами. Однако трубочки, содержащие рецептор, возвращают его к клеточной поверхности (рис. 9.7). В этом случае сортировка несомненно происходит внутри эндосомного (или прелизосомного) комплекса органелл.

Какой механизм лежит в основе быстрой сортировки макромолекул? Конечно, должны существовать особые структурные «сигналы», приводящие к компартиментализации специфических рецепторов и лигандов. Единственным известным сигналом является маннозо-6-фосфат, который присутствует на ферментах, направляющихся в лизосомы [778]. Маннозо-6-фосфатспецифичные рецепторы находятся в комплексе Гольджи, где они направляют иовосинтезированные белки в лизосому (экзоцитозный путь; разд. 10.2), а также на плазматической мембране, где они вызывают секрецию таких ферментов во внешнюю среду (эндоцитозный путь).

Помимо специфических структурных сигналов сортировки большую роль играет закисление внутриклеточных везикулярных ком-

партментов [956]. Значение pH в эндоцитозных пузырьках составляет 5,0 — 6,2 [746]. При столь низких pH происходит диссоциация комплексов рецептор—лиганд, включающих липопротеины низкой плотности, лизосомные ферменты, асиалогликопротеины, фактор роста эпидермиса и инсулин. В таких условиях от комплекса трансферрин—рецептор отсоединяются и два атома железа, хотя в этом случае апотрансферрин остается связанным со своим рецептором.

У некоторых оппортунистических вирусов и токсинов выработались механизмы проникновения в клетку, основанные на закислении везикул [966]. Например, дифтерийный токсин связывается с каким-то неидентифицированным рецептором на клеточной поверхности и затем поглощается эндоцитозным путем. Понижение pH эндоцитозных везикул индуцирует в молекулах токсина конформационное изменение, что приводит к его проникновению через везикулярную мембрану и позволяет ферментативно активной части токсина достичь цитоплазмы. pH-индуцируемое конформационное изменение может вызвать образование трансмембранной поры (см. разд. 8.6.1). Многие вирусы животных, имеющие оболочку, тоже попадают в цитоплазму путем эндоцитоза. Низкое значение pH, отмечаемое в эндоцитозных везикулах, индуцирует конформационное изменение в гликопротеинах, входящих в состав шиповидных структур вирусных мембран, что облегчает как слияние мембраны вируса с мембраной эндоцитозной везикулы, так и доставку вирусного генома в цитоплазму. Примерами могут служить вирус леса Семлики и вирус гриппа. Различные аспекты процесса слияния мембран обсуждаются в разд. 9.5.

pH во внутриклеточных компартментах может повышаться при добавлении слабых оснований (например, примаксина, хлорохина, метиламина и хлорида аммония) или ионофоров (таких, как моненсин) [956]. Слабые основания могут проходить через липидный бислой в незаряженной форме и протонироваться в кислом содержимом компартмента. В результате pH в компартменте может повышаться на 1—2 единицы и блокировать многие pH-зависимые процессы. Такие слабые основания часто называют «лизосомотропными» или «ацидотропными» агентами. Моненсин уравнивает протонный и K^+ -градиенты (разд. 7.5.2), что также увеличивает pH в вакуолях.

Добавление этих агентов часто предотвращает рециклирование рецепторов клеточной поверхности. Комплексы рецептор—лиганд при этом не диссоциируют, и рецепторы накапливаются во внутренних мембранных везикулах, не достигая клеточной поверхности. Такая картина наблюдается, например, для ЛНП- и асиалогликопротеинового рецепторов. По-видимому, обмен между периферическими эндосомами и плазматической мембраной при этом не ослабевает [1287, 863], однако миграция к лизосомам может блокироваться [863].

Большие успехи в изучении этой сложной системы сортировки были достигнуты благодаря применению электронной микроскопии при искусном использовании таких клеток, как пероксидаза хрена, а также (сравнительно недавно) рН-контролирующих меток [1100]. Весьма полезными оказались и генетические подходы, основанные на резистентности к определенным токсинам и вирусам при неполном закислении эндоцитозных везикул [956]. Источником соответствующих мутантов могут быть дрожжи [1218]. Биохимические исследования основываются на выделении и характеристике хорошо известных субпопуляций эндоцитозных везикул. Для разделения эндоцитозных и экзоцитозных везикул используются специально разработанные электрофоретические методы [834, 927], подходы, основанные на иммунологическом сродстве [555], а также процедуры со смещением плотности при использовании холинэстеразы [617, 834]. В некоторых лабораториях удалось провести слияние изолированных эндоцитозных пузырьков *in vitro* и показать, что для этого необходим АТР; слияние происходило только в случае эндоцитозных пузырьков, полученных в течение 5 — 15 мин после интернализации [555, 285, 130].

9.4.3. КЛАТРИН [1130]

При эндоцитозе наблюдаются в первую очередь такие структуры, как окаймленные ямки и окаймленные везикулы. Их характерной особенностью является наличие на цитоплазматической поверхности полигональной решетки, образуемой клатрином. Свойства клатрина и ассоциированных с ним белков определяют, какие именно рецепторы скапливаются в окаймленных ямках; эти свойства каким-то образом опосредуют и изменение мембраны, приводящее к отшнуровыванию окаймленных везикул. Молекула клатрина содержит три тяжелых цепи (180 кДа) и три легкие (30 — 40 кДа) и имеет сложную структуру с тремя ветвями; каждая из ветвей образована одной тяжелой цепью и одной легкой. Выделенный клатрин спонтанно ассоциирует с образованием полигональной решетки как в присутствии, так и в отсутствие мембран. Работы по реконструкции с очищенными плазматическими мембранами показали, что в местах образования окаймленных ямок имеется ограниченное число участков связывания с высоким сродством к клатрину [1014]. С клатриновой решеткой связаны и вспомогательные белки с мол. массами 100 и 50 кДа.

Каждая клетка продуцирует два основных класса легких цепей клатрина. Они кодируются двумя разными генами, мРНК которых подвергается дифференциальному сплайсингу, что приводит к появлению по меньшей мере четырех разновидностей белков [685, 758]. Тяжелые цепи играют структурную роль, а легкие, вероятно,

выполняют регуляторную функцию и содержат места связывания кальмодулина, а также АТР-зависимого раздвигающего белка [1253]. В клетке половина клатрина находится в растворе, и между этой формой и мембранными структурами поддерживается динамическое равновесие. До слияния окаймленных везикул с эндоцитозной системой из них должен высвободиться клатрин; эта реакция катализируется раздвигающим белком, который выполняет чисто каталитическую функцию, однако остается прочно связанным с молекулами клатрина даже в отсутствие клатриновой решетки. В клетке этот белок находится в избытке по отношению к клатрину.

Чтобы понять природу рецепторзависимого эндоцитоза и его регуляции, необходимо выяснить механизм перехода клатрина из мономерной формы в мембраносвязанную структуру и обратно, а также механизм образования таких структур на мембране.

9.4.4. НЕКОТОРЫЕ ПРИМЕРЫ ИНТЕРНАЛИЗУЕМЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Рассмотрим вкратце свойства некоторых рецепторов. Все они имеют единственный трансмембранный домен, но этим сходство и ограничивается. Мы остановимся на рецепторах групп I, III и IV. Рецепторы пептидных гормонов, относящиеся к группе II, описаны в разд 9.7.

ЛНП-рецептор человека [152, 1404]

Это типичный рецептор группы I, который возвращается к плазматической мембране, в то время как его лиганд, сывороточный липопротеин низкой плотности (ЛНП), попадает в лизосому. Особенно богаты этим рецептором клетки печени и надпочечников, куда ЛНП поставляют холестерол для синтеза желчных кислот и стероидных гормонов соответственно. По данным об аминокислотной последовательности рецептора, определенной с помощью кДНК, он состоит из пяти доменов (рис. 9.8). Выраженная гомология с другими мембранными рецепторами отсутствует, хотя два самых крупных наружных домена содержат повторы, богатые цистеином и гомологичные соответственно фактору С9 комплемента и предшественнику ФРЭ. Рецептор имеет единственный трансмембранный домен и непротяженный цитоплазматический С-концевой домен. Показано, что у лиц с таким генетическим заболеванием, как семейная гиперхолестеролемия, ЛНП-рецепторы не функционируют. Установить функции структурных доменов рецепторов помог мутационный анализ. Так, было показано, что модификации в цитоплазматическом домене ЛНП-рецептора препятствуют связыванию рецептора с окаймленными ямками, даже если связывание ЛНП с рецептором не изменяется [833, 289]. Помимо выявления мутаций, про-

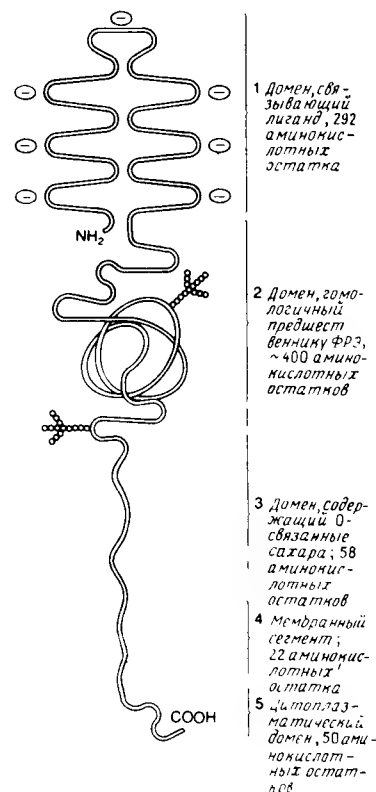


Рис. 9.8. Схематическое представление пяти структурно различающихся доменов ЛНП-рецептора человека [152].

исходящих *in vivo*, проводились опыты *in vitro* для получения необходимых мутаций и определения свойств экспрессированного продукта гена. Для этого применялась рекомбинантная ДНК, в которой отсутствовал ген, который кодирует домен, гомологичный предшественнику ФРЭ (домен 2). Такой рецептор связывает ЛНП, но не высвобождает его при закислении [288]. Это блокирует рециклирование рецептора и ведет к его деградации после связывания лиганда.

Асиалогликопротеиновый рецептор

Этот рецептор группы I, называемый также печеночным лектином, связывается с десилированными гликопротеинами сыворотки и узнает гликопротеины с галактозой или N-ацетилгалактозой на конце. Следует отметить две интересные особенности: 1) рецептор

имеет единственный трансмембранный сегмент и является одним из нескольких рецепторов, у которых N-конец обращен в цитоплазму [1371, 844] (см. рис. 10.3); 2) в растворе детергента этот рецептор находится в виде гексамера [870], причем множество таких гексамеров встречается и в мембране. Асиалогликопротеиновый рецептор гомологичен рецептору с низким сродством к IgE, который находится на лимфоцитах человека [747] и функция которого неизвестна.

Рецептор для полимерного (IgA/IgM) иммуноглобулина [1024, 1023]

Этот рецептор (группа III) связывает иммуноглобулины IgA или IgM из сыворотки и транспортирует их от базолатеральной мембраны к апикальной поверхности гепатоцитов (рис. 9.7). Во время этого процесса рецептор расщепляется и часть его, связанная с молекулой Ig, высвобождается в желчь гепатоцитов. Таким образом, рецептор используется только один раз и не восстанавливается. Как видно из рис. 9.3, данный рецептор относится к суперсемейству иммуноглобулинов и имеет пять внеклеточных иммуноглобулиноподобных доменов. Показано, что его цитоплазматический домен существен для эндоцитоза [1023].

Трансферриновый рецептор

Этот рецептор (группа IV) участвует в поглощении железа из сыворотки. Рецептор связывается с трансферрином, содержащим два атома железа, интернализуется и остается связанным с апотрансферрином после отсоединения атомов железа в кислых эндцитозных везикулах. Как и в случае ЛНП-рецептора, концентрирование этого рецептора в окаймленных ямках и его интернализация продолжают и в отсутствие лиганда. Рецептор представляет собой димер с дисульфидными связями, гликозилированный и ацилированный по меньшей мере по одному остатку цистеина, который был идентифицирован с помощью сайт-специфического мутагенеза [710]. Одна субъединица состоит из 760 остатков, и ее N-конец обращен в цитоплазму. Для интернализации трансферринового рецептора, как и рецепторов ЛНП, IgA (IgM) и ФРЭ, необходимо наличие цитоплазматического домена [1247]. Этот домен содержит несколько сериновых остатков, которые могут быть фосфорилированы, но, как было показано, эти остатки несут существенны для интернализации [1247]. Тем не менее было установлено, что форболовые эфиры, активирующие протеинкиназу C (разд. 9.7.2), уменьшают число трансферриновых рецепторов на поверхности клетки и попутно вызывают их фосфорилирование [943, 673]. Напротив, инсулин

и другие митогены способствуют концентрированию рецептора на клеточной поверхности, по-видимому, путем увеличения скорости его экстернализации [1550, 1437]. Механизм этого явления неизвестен, но полагают, что распределение этого и других рецепторов между плазматической мембраной и внутренними везикулами является важным регуляторным фактором.

9.5. Слияние мембран [1594, 881, 1593, 1571]

Анализ процессов перемещения мембранных компонентов, предпринятый в предыдущем разделе, показывает, что слияние отдельных мембранных структур внутри клетки является весьма распространенным и очень существенным клеточным процессом. Такое слияние должно происходить очень быстро и с высокой избирательностью, без утечки вакуолярного содержимого в цитоплазму. Регуляция процесса должна быть очень тонкой. Например, плазматическая мембрана быстро сливается с периферическими эндочитозными пузырьками, но не с плазматическими мембранами соседних клеток; с ними она слипается. Каков механизм слияния мембран и как он регулируется? Ответы на эти вопросы пока не получены, но из экспериментов на модельных мембранах установлены минимальные требования к слиянию мембран [1594] и показано, что в быстром и избирательном слиянии могут участвовать белки; об этом свидетельствуют результаты работ с использованием белков шпидовидных выростов оболочки вирусов животных [1571]. Эти исследования показали, что слияние может происходить по крайней мере в два этапа. Во-первых, сливающиеся мембраны должны вступить в тесный контакт. Для этого необходимо преодолеть электростатическое отталкивание и, что наиболее важно, должна произойти дегидратация полярных групп липидных молекул. Во-вторых, в плотно прилегающих друг к другу бислоях должен существовать некий локальный дефект упаковки, чтобы могли реализоваться межмембранные гидрофобные взаимодействия. На каждом из этих этапов могут принимать участие белки, что, вероятно, и происходит *in vivo*.

9.5.1. РАБОТЫ С ЛИПИДНЫМИ ВЕЗИКУЛАМИ

Для опытов использовали две модельные системы: слияние липидных везикул и слияние плоской модельной мембраны с липидными везикулами [9]. За процессом слияния можно следить с помощью светового или электронного микроскопа [718], но чаще проводят прямой количественный анализ слияния внутренних компарментов или смешивания липидов, образующих везикулы [1594, 362]

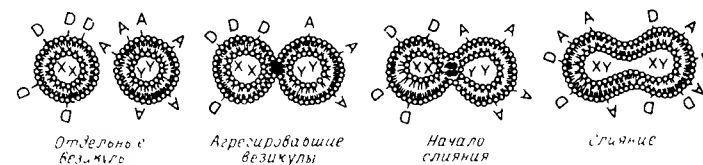


Рис. 9.9. Слияние фосфолипидных везикул. Липидные фазы и содержимое везикул при простой агрегации везикул не перемешиваются. Инициация слияния представлена как разрастание флуктуационного дефекта в бислое, при этом образование какой-то специальной структуры не подразумевается. Как только происходит слияние, липидные фазы и содержимое везикул перемешиваются. Во многих экспериментах с фосфолипидными везикулами слияние сопровождается утечкой содержимого.

(рис. 9.9). Пусть одна группа везикул содержит дипиколиновую кислоту, а другая — Tb^{3+} . При слиянии везикул и смешивании их содержимого эти два реагента быстро образуют сильно флуоресцирующий Tb^{3+} -дипиколинатный комплекс, что и позволяет проводить количественные измерения. За процессом смешивания липидов можно следить, измеряя эффективность переноса энергии электронного возбуждения между флуоресцирующими липидными молекулами, принадлежащими до смешивания разным везикулам [1343]. Эти методы позволяют различать агрегацию везикул и их истинное слияние [362].

Замечательной особенностью однослойных фосфолипидных везикул является то, что самопроизвольно они сливаются с большим трудом. Хотя между противоположными фосфолипидными бислоями существует ван-дерваальсово взаимодействие, между ними имеется также сильное электростатическое отталкивание, особенно в том случае, когда везикулы содержат отрицательно заряженные фосфолипиды. Например, везикулы, содержащие фосфатидилсерин, не будут агрегировать, поскольку существует значительный энергетический барьер, препятствующий образованию плотного контакта между мембранами, необходимого для образования комплекса. Все фосфолипиды, включая цвиттерионные липиды (такие, как фосфатидилхолин), связываются с водой, и для того, чтобы два близлежащих бислоя могли вступить в прямой контакт, этот поляризованный водный слой на поверхности липидного бислоя должен быть удален. Дегидратация фосфолипидов требует больших энергетических затрат, и роль агентов, облегчающих слияние мембран, состоит, в частности, в снижении этого энергетического барьера. Некоторые фосфолипиды (например, фосфатидилэтаноламин) гидратированы в меньшей степени, чем другие, и образуют везикулы, которые сливаются гораздо легче. Например, везикулы, состоящие из фосфатидилэтаноламина/фосфатидилсерина, сливаются эффективнее, чем везикулы из фосфатидилхолина/фосфатидилсерина

[718]. Везикулы, состоящие из фосфатидилэтаноламина, слипаются друг с другом сильнее, чем везикулы из фосфатидилхолина, из-за различий в степени гидратации [718].

Дополнение 9.2. Агенты, облегчающие слияние мембран

1. *Кальций* [718, 845]. При добавлении Ca^{2+} к везикулам, содержащим анионные липиды (такие, как фосфатидилсерин или фосфатидная кислота), часто происходит их слияние. Если везикулы состоят только из анионных липидов, добавление Ca^{2+} приводит к разрушению везикул; если же анионные липиды смешаны с нейтральными (в соотношении 1 : 1), такими, как фосфатидилэтаноламин, то происходит слияние. Для этого необходимы высокие концентрации Ca^{2+} (~10 мМ), который не может быть заменен Mg^{2+} . Ca^{2+} нейтрализует отрицательный поверхностный заряд, создаваемый анионными липидами, и облегчает агрегацию везикул. Кроме того, Ca^{2+} особенно эффективен при образовании мостика между анионными фосфолипидами в близлежащих бислоях благодаря формированию прочного комплекса $\text{Ca}(\text{фосфатидилсерин})_2$ (см. разд. 7.3.3). Это приводит к дегидратации липидов, т. е. выталкиванию воды из пространства между противоположными бислоями. Mg^{2+} стабилизирует агрегацию везикул, но обычно не стабилизирует тесный контакт дегидратированных противоположных бислоев, причем эффективность его действия зависит от липидного содержания везикул.

Деформация, происходящая при адгезии везикул, приводит к напряжению в мембранах, которое снимается при слиянии [718]. Слияние облегчается при наличии дефектов упаковки липидного бислоя, возникающих из-за каких-то локальных флуктуаций или образующихся на границе раздела фаз в присутствии Ca^{2+} . Как правило, четкой корреляции между условиями, приводящими к слиянию везикул, и условиями, облегчающими крупномасштабное разделение фаз липидов, не обнаруживается [1594]. Ca^{2+} -индуцируемое слияние часто сопровождается лизисом.

Ca^{2+} способствует также слиянию везикул из анионных липидов с плоскими мембранами [9]. Однако в этом случае необходимым условием является наличие осмотического градиента или на везикуле, или на плоской мембране. По-видимому, слияние стимулируется благодаря дополнительным механическим напряжениям. Высказывалось предположение, что осмотическое набухание является движущей силой слияния мембран *in vivo* [881], но пока это не подтверждено экспериментально [1632].

Имеет ли Ca^{2+} -индуцированное слияние какое-либо физиологи-

ческое значение? Часто замечали, что во многих случаях слиянию *in vivo* предшествует изменение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (например, такая картина наблюдается при слиянии секреторных гранул с плазматической мембраной). Но концентрации Ca^{2+} , требуемые для этого *in vitro*, гораздо выше физиологических. С другой стороны, отмечалось, что если два липидных бислоя уже тесно контактируют друг с другом, то их сродство к Ca^{2+} очень высоко и образование Ca^{2+} -мостиков между противоположными мембранами может индуцироваться при изменениях концентрации Ca^{2+} , не выходящих за пределы физиологического диапазона [414].

Образуются ли при слиянии липидных бислоев какие-то промежуточные формы? Этот вопрос широко обсуждался. Рассматривалась возможность существования липидных частиц и небислойных форм ([1594, 1593]; разд. 2.2). Однако об образовании редко встречающихся короткоживущих промежуточных структур, возникающих при слиянии липидных бислоев, мало что известно.

2. *Полиэтиленгликоль и декстран*. Эти агенты используются довольно часто, но охарактеризованы они хуже, чем Ca^{2+} . Обычно считают, что они вызывают дегидратацию везикул, приводящую к их агрегации и слиянию [897].

3. *Слияние под действием электрических сил* [1405]. Слияние фосфолипидных везикул, как и клеток, можно индуцировать с помощью коротких электрических импульсов. Под действием высокого напряжения в мембранах образуются поры (см. разд. 8.6.4), что может привести к образованию тесного контакта между липидными бислоями. При наложении сильного электрического поля в мембранах могут также возникнуть долговременные дефекты, которые, по-видимому, облегчают образование гидрофобных контактов между близлежащими липидными бислоями.

4. *Белки и пептиды*. Показано, что слиянию везикул способствуют многие растворимые белки [750] и амфифильные пептиды [1016, 1040]. Во многих случаях этот процесс зависит от pH и протекает только при протонировании соответствующих групп белковой молекулы (pH < 6,0). Например, в кислых условиях α -лактальбумин подвергается конформационному изменению, приводящему к экспонированию гидрофобной петли, что облегчает связывание с фосфолипидными везикулами [750]. Это каким-то образом облегчает слияние везикул. Слиянию фосфатидилхолиновых везикул способствуют два амфифильных пептида — мелиттин [1040] (см. разд. 3.7.1) и δ -гемолизин [1016] из *S. aureus*. Оба они имеют гидрофобный участок, который может связываться с мембранами. Вероятно, благодаря локальному разрушению бислоя преодолеваются электростатический и гидратационный барьеры, затрудняющие агрегацию и слияние везикул. Высказывалось предположение, что при необходимости подобные гидрофобные пептиды могут образовываться и *in*

vivo [879], однако убедительные данные на этот счет отсутствуют. Кроме того, известно, что отдельные участки белковых молекул могут вызывать такой же эффект без расщепления с последующим образованием пептидов.

9.5.2. ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ШИПОВИДНЫХ СТРУКТУР ОБОЛОЧКИ ВИРУСОВ [1571, 1585]

Конечно, описанная выше способность таких белков, как α -лактальбумин, облегчать слияние никак не связана с их физиологической ролью. Однако имеются белки, функция которых состоит именно в ускорении слияния мембран. Это гликопротеины шиповидных структур оболочки вирусов животных. Вирионы этих вирусов имеют бислойную липидную оболочку, с которой связаны вирус-специфические белки (см. разд. 4.5.3), опосредующие слияние вирусов с клеткой (рис. 9.10). Некоторые вирусы (например, вирус Сендай) сливаются с плазматической мембраной, другие (например, вирус гриппа) связываются с рецепторами на плазматической мембране (сиалогликопротеинами) и проникают в клетку путем эндоцитоза. Эти вирусы сливаются с мембраной эндоцитозных пузырьков только после закисления их содержимого (при pH 5—6).

Белки шипов выполняют две функции: 1) с их помощью вирусная частица прикрепляется к мембране животной клетки, обычно к гликопротеину или гликолипиду; 2) вероятно, они взаимодействуют непосредственно с мембраной клетки-мишени, так что мембра-

(А) Слияние с плазматической мембраной

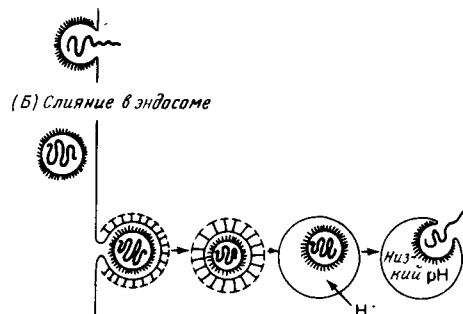


Рис. 9.10. Механизмы проникновения вирусов с оболочкой в клетку [1571]. А. Проникновение в клетку парамиксовируса (например, вирус Сендай) при нейтральном pH. Б. Механизм, используемый многими другими вирусами, в том числе вирусом гриппа. Через окаймленные ямки вирус попадает в эндоцитозные везикулы. При закислении вакуоли индуцируется слияние вирусной мембраны и мембраны эндосомы.

ны вируса и клетки-хозяина приходят в тесный контакт и их слияние ускоряется. У некоторых вирусов функции прикрепления и ускорения слияния выполняют разные белки, а у других — один и тот же белок. В качестве примера можно привести В-белок вируса везикулярного стоматита и гемагглютинин (НА) вируса гриппа, участвующие в обоих процессах. Каждый из этих белков представляет собой гомотример, состоящий из трех идентичных субъединиц. Белки были очищены и встроены в липосомы, которые приобрели способность как к приклеплению, так и к слиянию [977]. Способность к слиянию в обоих случаях проявлялась только при слабо кислых условиях, которые соответствовали значению pH внутри эндоцитозных пузырьков. Эта способность, по-видимому, определялась небольшими сегментами белков, находящимися вблизи N-конца. Синтетический пептид из 25 аминокислотных остатков, соответствующий N-концевой последовательности В-белка вируса везикулярного стоматита, проявляет pH-зависимую гемолитическую активность, сходную с таковой самого вируса [1295]. Как соотносится это наблюдение со свойствами G-белка, пока неясно [1604].

Дополнение 9.3. Гемагглютинин вируса гриппа — наиболее полно охарактеризованная гликопротеиновая структура

Этот белок связан с вирусной мембраной с помощью короткого трансмембранного домена на С-конце. Он синтезируется как единая полипептидная цепь, но при созревании претерпевает протеолитическое расщепление с образованием двух полипептидов, HA_1 и HA_2 , связанных дисульфидной связью. Участок, отвечающий за слияние, локализован на N-конце HA_2 . Он соответствует N-концу G-белка вируса везикулярного стоматита.

С помощью рентгеновской кристаллографии была определена трехмерная структура водорастворимого домена гемагглютинина [1595] (рис. 9.11). Этот домен получают с помощью расщепления бромелаином. Он представляет собой тример из $(HA_1 + HA_2)$ -субъединиц, напоминает по форме стержень и выступает из мембраны на 135 Å. Каждая субъединица имеет α -спиральный «стебель» с глобулярной «верхушкой», которая содержит рецепторный участок для сиалогликоосоединений.

Гидрофобный фузионный пептид спрятан между субъединицами тримера и находится на расстоянии 30 Å от поверхности мембраны. Как известно, при низких pH третичная и четвертичная структуры белка необратимо изменяются [1259]. При pH 5,0 белок приобретает способность связывать липиды и детергенты и самоагре-

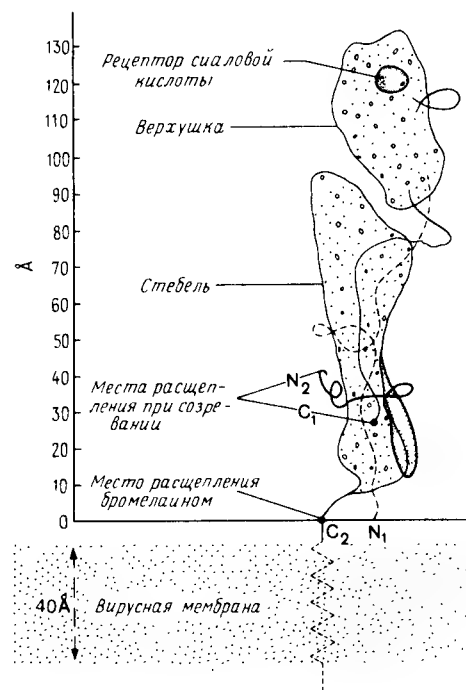


Рис. 9.11. Схема, иллюстрирующая основные особенности мономерной единицы белковой части гемагглютинаина, полученной из вирусной мембраны с помощью бромелайна; после обработки бромелайном в мембране остается участок длиной 46 аминокислотных остатков [1259]. В зрелой форме N-конец HA_2 (N_2) и С-конец HA_1 (C_1) находятся друг от друга на расстоянии 21 Å. Протеолитическое расщепление участка между этими остатками существенно для созревания. Фузионный пептид находится на N-конец HA_2 . На самом деле белок является тримером, состоящим из трех таких субъединиц. Детальная его структура получена кристаллографическим методом.

гируется, что позволяет думать об экспонировании гидрофобного домена. По-видимому, это коррелирует с экспонированием фузионного пептида, который теперь может связаться с мембраной-мишенью, способствуя сближению обеих мембран и облегчая их слияние. Были выделены [280] и получены *in vitro* [510] мутанты с другими рН-оптимумом и фузионными свойствами. Это подтверждает важность контактирования субъединиц при рН-зависимом конформационном изменении структуры белка [280] и роль фузионного пептида [510]. Гемагглютинин ацилирован жирными кислотами, которые, по-видимому, усиливают фузионную активность [817].

Суммируя все сказанное выше, можно сделать вывод, что, хотя физико-химические механизмы слияния мембран до конца не установлены, очевидно, что специфическое слияние мембран внутри клетки может осуществляться с помощью некоего белокзависимого процесса. Для этого должно произойти специфическое межмембранное взаимодействие, обеспечивающее прикрепление мембран друг к другу, и должен присутствовать мембранный белок, который при необходимости обеспечивает слияние. Для изучения свойств таких белков можно использовать белки, образующие шиповидные структуры вирусных частиц. Но могут применяться и другие модельные системы. Вероятно, семейство таких белков участвует в слиянии мембран как при экзоцитозе, так и при эндоцитозе.

9.6. Рецепторные системы бактерий обладают некоторыми свойствами, присущими и высшим организмам

В первой части этой главы мы говорили о рецепторах, предназначенных исключительно для адгезии и поглощения макромолекул, и указывали на динамическое состояние плазматической мембраны как компонента эндоцитозного пути. Во второй части мы остановимся на вопросе о том, как клетки отвечают на внешние химические сигналы (метаболиты, гормоны или нейромедиаторы). Во всех клеточных ответах участвуют системы передачи сигнала, которые преобразуют событие, происходящее вне клетки, — связывание лиганда с рецептором, — в сложный внутриклеточный ответ. В этом разделе мы рассмотрим системы передачи сигналов у бактерий, а далее суммируем данные по таким системам у животных клеток.

Бактерии реагируют на изменение концентрации различных растворимых веществ в окружающей среде. Свободноплавающие бактерии, например *E. coli*, обладают способностью к хемотаксису и при увеличении содержания в среде специфических питательных веществ перемещаются вверх по градиенту их концентрации, к источнику питания. В этом процессе участвуют рецепторы цитоплазматической мембраны, которые связываются с «привлекательным» для бактерии растворенным веществом и индуцируют серию событий в цитоплазме, приводящих к вращению жгутиков. Сходным образом клетки *E. coli* реагируют на уменьшение концентрации фосфата или азота, синтезируя белки, которые придают клеткам способность «улавливать» эти компоненты из окружающей среды. В этом процессе также участвуют специфические рецепторы цитоплазматической мембраны.

Такие системы ответа активно изучались в первую очередь с по-

мощью генетических и молекулярно-биологических методов. Данные по гомологии аминокислотных последовательностей позволили идентифицировать два семейства белковых рецепторов прокариот.

1. Рецепторы, участвующие в хемотаксисе (*E. coli*, *S. typhimurium*) и влияющие на вращение жгутиков.

2. Рецепторы, опосредующие ответы, которые влияют на аппарат транскрипции и активность генов.

Изученные типы рецепторов поражают своим сходством с рецепторами, характерными для клеток высших организмов. Краткое знакомство с некоторыми из них послужит введением к обсуждению в разд. 9.7 более сложных систем у клеток животных.

9.6.1. РЕЦЕПТОРЫ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ХЕМОТАКСИС *E. coli*

К этому семейству белков относятся четыре рецептора. Их часто считают продуктами четырех генов — *tsr*, *tar*, *tap* и *trg*. Например, *tsr*-белок связывается с аттрактантом серином, а также опосредует хемотаксис в ответ на репеллент лейцин. Наиболее полно изучен рецептор для аспартата (продукт гена *tar*), который связывается с аттрактантом аспартатом, а также с мальтозосвязывающим белком (см. разд. 8.4.3). Все четыре рецептора содержат единственную полипептидную цепь (~60 кДа). Данные об их первичной структуре позволяют предположить, что это трансмембранные белки, которые имеют по две пронизывающие мембрану α -спирали. Характер укладки рецептора для аспартата, представленный на рис. 9.12, согласуется с результатами экспериментов по слиянию генов [918], а также с генетическими [1264] и биохимическими [454] данными. Биохимические свойства рецептора для аспартата [454] свидетельствуют о том, что он, по-видимому, представляет собой тетрамер. Все четыре хемотаксических белковых рецептора имеют высококонсервативные С-концевые половины, составляющие цитоплазматические домены; N-концевые части, составляющие периплазматические домены, гораздо менее консервативны.

Рецептор для аспартата выполняет три разные функции.

1. **Связывание аспартата**, за которое ответствен N-концевой домен, обращенный в периплазму. Белки с укороченным цитоплазматическим доменом тем не менее связываются с аспартатом нормально.

2. **Передача сигнала**, в которой участвуют аминокислотные остатки трансмембранных спиралей [1095]; об этом свидетельствуют результаты замещения лизина в положении 19 на аланин в первой трансмембранной спирали (рис. 9.12). Полученный мутантный рецептор связывает аспартат, но не индуцирует ответной реакции, что, вероятно, обусловлено изменением конформации белковой мо-

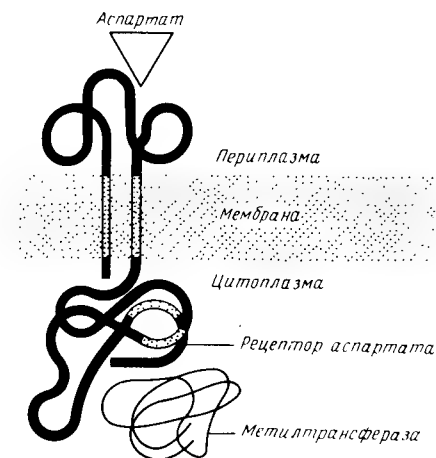


Рис. 9.12. Модель хемотаксического рецептора *E. coli* для аспартата [454]. Показано положение двух гидрофобных сегментов, а также места ковалентной модификации при метилировании и деметилировании (отмечены точками). Схематически изображена метилтрансфераза. Реальная укладка полипептидных цепей неизвестна.

лекулы. Показано также, что рецептор может связываться с аспартатом и с мальтозосвязывающим белком одновременно, при этом ответы усиливают друг друга [1026]. Природа конформационного изменения в рецепторе, индуцируемого связыванием лиганда, неизвестна, но, по-видимому, это изменение затрагивает значительную часть полипептида [408]. Механизм, с помощью которого рецептор влияет на «мотор», приводящий в движение жгутики, также неизвестен; установлено только, что в нем участвует С-концевой домен рецептора [1353] и он может быть связан с фосфорилированием одного из других белковых компонентов системы [626].

3. **Адаптация**, которая заключается в том, что система способна реагировать на увеличение концентрации лишь непродолжительное время; через несколько минут рецептор десенсибилизуется, т. е. адаптируется к новой концентрации аттрактанта. Но затем рецептор вновь приобретает способность реагировать на дальнейшие изменения концентрации аттрактанта. Частично это связано с метилированием и деметилированием рецептора по нескольким глутаминовым остаткам, расположенным в цитоплазматическом домене [1264, см. также 1393]. Адаптация отсутствует у рецепторов с укороченным С-концом [1264]; эта мутантная форма реагирует на аспартат в течение всего времени, пока последний находится в среде.

В ходе многочисленных экспериментов была продемонстрирована кажущаяся независимость функциональных доменов, распо-

женных на N- и C-концах белка [1264, 788]. Исследовались химерные белки, у которых N-концевая часть представляла собой продукт гена *lsr* (сериновый рецептор), а C-концевая — рецептор для аспартата [788]. Такие белки обладали хемотаксической активностью по отношению к серину. Подобные конструкции наблюдались также у семейства рецепторов пептидных гормонов животных клеток (см. разд. 9.7).

Из всего сказанного можно сделать следующие выводы.

1. Существует семейство трансмембранных рецепторов с родственными последовательностями.

2. Наличие у рецепторов разных функций предполагает, что у них имеются разные структурные и функциональные домены.

3. И высшие, и низшие организмы обладают системой передачи сигнала, в которую вовлечены другие цитоплазматические белки, вероятно каким-то образом модифицирующиеся благодаря конформационному изменению, которое претерпевает рецептор при связывании лиганда.

4. Система адаптируется к сигналу, т. е. может отвечать на него лишь непродолжительное время. Это свойство присуще многим системам клеточного ответа; его называют также десенсибилизацией (разд. 9.7.4).

9.6.2. РЕЦЕПТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ [1241]

Это второе семейство рецепторов обнаружено у множества бактерий, которые отвечают на сигнал активацией транскрипции отдельных генов. Во всех случаях система имеет два белковых компонента: 1) *сенсор*, или *рецептор*, и 2) *регулятор*. Все рецепторы, по-видимому, имеют сходную структуру. Они содержат две трансмембранные спирали в N-концевой половине молекулы. C-концевые последовательности представителей этого семейства, находящиеся (по аналогии с хемотаксическими рецепторами) на цитоплазматической стороне мембраны, в значительной степени гомологичны (рис. 9.12). Регуляторные белки, по-видимому, находятся в цитоплазме в растворимой форме. Вероятно, рецепторы каким-то образом модифицируют эти белки, и затем они прямо или косвенно активируют транскрипцию. Возможно, модификация состоит в фосфорилировании; об этом свидетельствуют данные, полученные при исследовании системы ответа на ограничение концентрации азота. В разд. 9.7.4 будет обсуждаться ключевая роль фосфорилирования белков в передаче сигналов в животной клетке.

Рассмотрение семейства бактериальных рецепторов показывает, что на основе одной структурной идеи может быть получено соответствие между самыми разными лигандами и ответами на них. Об

этом же свидетельствует и изучение некоторых рецепторов животных клеток ([984]; табл. 9.1). Система передачи сигнала в животных клетках в отличие от бактерий изучена весьма детально. О ней и пойдет речь в следующем разделе.

9.7. Передача сигналов в животных клетках

Животные клетки реагируют на самые разные вещества, содержащиеся во внешней среде. Первым шагом при этом всегда является связывание лиганда (т. е. нейромедиатора или гормона) со специфическим рецептором на наружной поверхности плазматической мембраны. Связывание с лигандом инициирует каскад специфических для данной клетки и рецептора событий, которые весьма интенсивно и плодотворно изучаются. Быстрое накопление новых данных в этой области вскоре потребует привлечения новых подходов для их систематизации. Однако наиболее общие проблемы здесь уже вполне ясны, даже при том, что многие детали малоизучены или неизвестны. В данном разделе мы ознакомимся с этими центральными вопросами и теми связанными с мембранами биохимическими явлениями, которые уже хорошо охарактеризованы.

В табл. 9.1 перечислены рецепторы животных клеток, которые участвуют в передаче сигнала; многие из них были клонированы и была определена их первичная структура. Таблица составлена таким образом, чтобы подчеркнуть их структурное сходство. Большинство рецепторов, опосредующих передачу сигнала, связывают либо митогенные агенты, либо нейромедиаторы. К митогенным агентам относятся такие вещества, как ФРЭ, пептидные гормоны и регуляторные пептиды (например, инсулин). Эти соединения регулируют рост клеток при различных условиях, в частности при эмбриогенезе, созревании клеток или их пролиферации, которая является частью иммунного ответа. К нейромедиаторам относятся адреналин, норадреналин, ацетилхолин, глицин и множество других малых молекул, участвующих в клеточном ответе.

Было бы полезно сказать еще несколько слов о классификации рецепторов (разд. 8.2.4), особенно рецепторов нейромедиаторов. В основе названий и классификаций этих рецепторов лежит их способность отвечать на различные агонисты и антагонисты (фармакологические свойства), а также их физиологические функции и локализация. Однако тот факт, что имеются рецепторы, отвечающие на один и тот же агонист, означает, что классификация, основанная на свойствах и локализации, не может использоваться для разграничения рецепторных белков. Например, адренергические рецепторы, специфически связывающие катехоламиновые агонисты, такие, как норадреналин и адреналин, были сначала подразделены на типы α и β и далее на подтипы α_1 , α_2 , β_1 и β_2 . Были выделены соот-

ветствующие рецепторные белки, правда, не все они строго вписывались в рамки классификации по фармакологическим признакам [342]. Аналогичным образом по фармакологическим признакам были выделены два класса мускариновых холинергических (ацетилхолиновых) рецепторов (M1 и M2) и идентифицированы по крайней мере четыре клонированных гена [121]. Они отличались от никотинового ацетилхолинового рецептора (разд. 8.2.4) по специфическому ответу на лекарственные препараты. Существуют также многочисленные классы рецепторов для гистамина, дофамина, опиатов и других агонистов. Можно ожидать, что в будущем благодаря применению биохимических методов и методов молекулярного клонирования удастся идентифицировать разные рецепторные белки и установить механизмы клеточного ответа. Это позволит по-новому подойти к классификации рецепторов, основанной на их фармакологических свойствах.

9.7.1. ПЕРВИЧНЫЙ ОТВЕТ И СЕМЕЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ

Лиганд, связываясь с рецептором, должен индуцировать в нем конформационный переход, приводящий к функциональным изменениям в других частях молекулы. Природа такого перехода абсолютно неизвестна. Установлено лишь, что по крайней мере в IgE-рецепторе с высоким сродством связывание лиганда индуцирует агрегацию рецептора в плоскости мембраны (разд. 9.7.5), однако нет никаких указаний на то, что это характерно для всех передающих сигнал рецепторов. Хотя структурные детали гормонов или нейромедиаторов остаются неизвестными, их важные функциональные особенности сейчас более или менее ясны. При связывании агониста происходят следующие три события (рис. 9.13).

1. Связывание агониста индуцирует открывание канала, образуемого рецептором. Примерами могут служить никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR), рецептор γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и глициновый рецептор. Все это рецепторы нейромедиаторов, которые структурно объединены в малое суперсемейство ([1302, 549]; табл. 9.1). На основании данных о первичной структуре этих рецепторов/ионных каналов для каждого полипептида была построена модель с четырьмя трансмембранными сегментами, однако экспериментальные исследования топологии nAChR еще не закончены (разд. 8.2.4).

2. При связывании лиганда активируется тирозиновая протеинкиназа, представляющая собой цитоплазматический домен рецептора. Обычно сам рецептор и является мишенью (происходит аутофосфорилирование), но данные о том, какие именно белки фосфорилируются и как они влияют на клетку, практически отсутствуют. Этот механизм используют рецепторы митогенных пептидных гор-

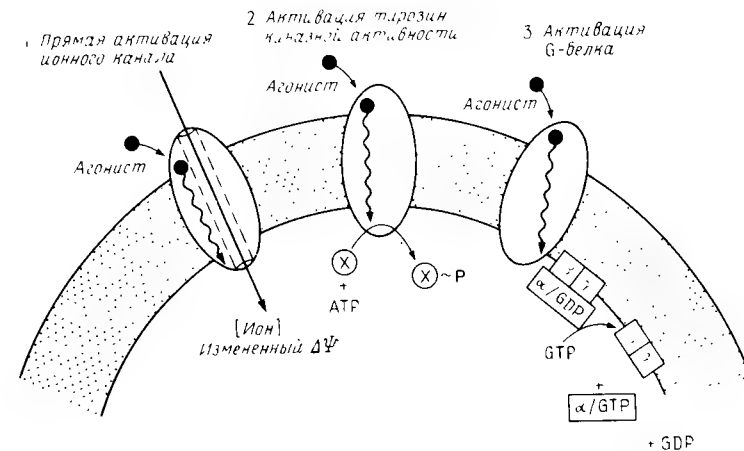


Рис. 9.13. Три первых охарактеризованных события, происходящих при связывании агониста с рецептором, расположенным в плазматической мембране. Волнистой стрелкой обозначено конформационное изменение, происходящее при связывании агониста. Субстратами тирозинспецифических протеинкиназных активностей являются в первую очередь белки. G-белок представлен в виде трехсубъединичного $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримера. Детали см. в тексте.

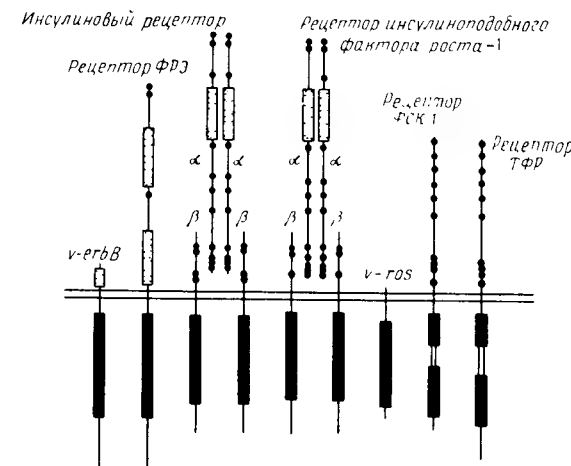


Рис. 9.14. Схематическое представление структурно сходных рецепторов для митогенных пептидов и некоторых родственных вирусных онкогенов [1476]. Рецепторы для инсулина и инсулиноподобного фактора роста-1 состоят из двух субъединиц, тогда как другие имеют только одну субъединицу. Некоторые рецепторы содержат богатые цистеином домены (они обозначены прямоугольниками с точками). Черными кружками обозначены другие остатки цистеина, находящиеся во внеклеточных доменах. Тирозинкиназные домены (черные прямоугольники) в одних случаях непрерывны, в других состоят из нескольких сегментов. Продукты двух онкогенов, *v-erbB* и *v-ros*, родственны ФРЭ-рецептору и β -субъединице инсулинового рецептора соответственно. ФСК-1 — фактор-1, стимулирующий образование колоний, ТФР — тромбоцитарный фактор роста, ФРЭ — фактор роста эпидермиса.

монов и факторов роста, причем многие из этих рецепторов структурно родственны между собой [1614] (рис. 9.14; табл. 9.1). Каждый из этих рецепторных полипептидов имеет по одному трансмембранному сегменту.

3. Рецептор образует комплекс с одной из групп мембраносвязанных GTP-связывающих белков, называемых G-белками. При связывании лиганда с рецептором в комплексе рецептор/G-белок происходит конформационное изменение, в результате чего облегчается обмен связанного GDP и GTP на G-белке. Последовательность происходящих событий изображена на рис. 9.15. G-белок активируется на короткое время, будучи связанным с GTP, и в этом состоянии может отделиться от рецептора, причем одна или больше субъединиц G-белка могут связаться с другими мембранными белками, обозначенными на рис. 9.15 словом «мишень», оказывая на них определенное воздействие. К этим мишеням относятся ионные каналы, аденилатциклаза, сGMP/фосфодиэстераза и фосфолипаза C. Более детальное описание G-белков дано в разд 9.7.2. К суперсемейству рецепторов [342], чье действие опосредуется G-белками,

принадлежат также β -адренергические рецепторы, мускариновые ацетилхолиновые рецепторы и опсины (световые рецепторы). Каждый из этих рецепторов имеет семь трансмембранных сегментов. На рис. 4.1 показана предполагаемая структура родопсина — наиболее полно охарактеризованного представителя этой группы.

9.7.2. G-БЕЛКИ [1400, 515]

Гуаниннуклеотидсвязывающие регуляторные белки, или G-белки, ответственны за передачу сигналов множества гормонов или нейромедиаторов к разнообразным мишеням клетки. Соответствующие примеры приведены в табл. 9.3. Четыре G-белка были очищены до гомогенного состояния и биохимически охарактеризованы: G_i (трансдукции), G_s , G_i и G_o . Оказалось, что каждый из них имеет уникальные мишени или эффекторные белки (рис. 9.15). G_i активирует сGMP-специфичную фосфодиэстеразу в наружных сегментах палочек сетчатки; G_s и G_i соответственно стимулируют и ингибируют аденилатциклазу и присутствуют во всех клетках; G_o представлен в большом количестве в клетках мозга и, по-видимому, ингибирует электрочувствительный Ca^{2+} -канал в нейронах [625]. Кроме того, почти несомненно имеются и другие, пока не выделенные G-клетки. G-белок G_p [228], вероятно, использует в качестве мишени фосфатидилинозитолспецифичную фосфолипазу C, которая инициирует быстрый распад фосфатидилинозитола в плазматической мембране и образование нескольких вторых посредников (разд. 9.7.3). Существует также G-белок, обозначаемый G_r , выделенный из мембран плаценты человека, однако его функция неизвестна [401]. Другой G-белок, G_k , по-видимому, открывает K^+ -специфичные каналы в сердечной мышце и других клетках [1283]; G-белки (G_e ?) участвуют также в регуляции экзоцитоза [167]. В некоторых случаях какой-то один G-белок внутри клетки может отвечать на связывание лиганда с одним из нескольких разных рецепторов. Такая ситуация скорее всего имеет место, например, для белка G_k из клеток ганглия *Aplysia* [1283]. Кроме того, G-белки могут иметь больше одной мишени. В качестве примера можно привести белок G_i , который активирует как сGMP-фосфодиэстеразу, так и фосфолипазу A2 в наружных сегментах палочек сетчатки быка [704]. По-видимому, в этих процессах активации участвуют различные субъединицы G_i .

Все четыре выделенных белка являются $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримерами. Биохимический анализ и анализ последовательности кДНК указывают на значительное различие между субъединицами (имеются, например, три α -субъединицы) [77], на существование по меньшей мере двух разных β -субъединиц [489, 444], а также на различия между γ -субъединицами [444]. α -Субъединицы связывают GDP и обла-

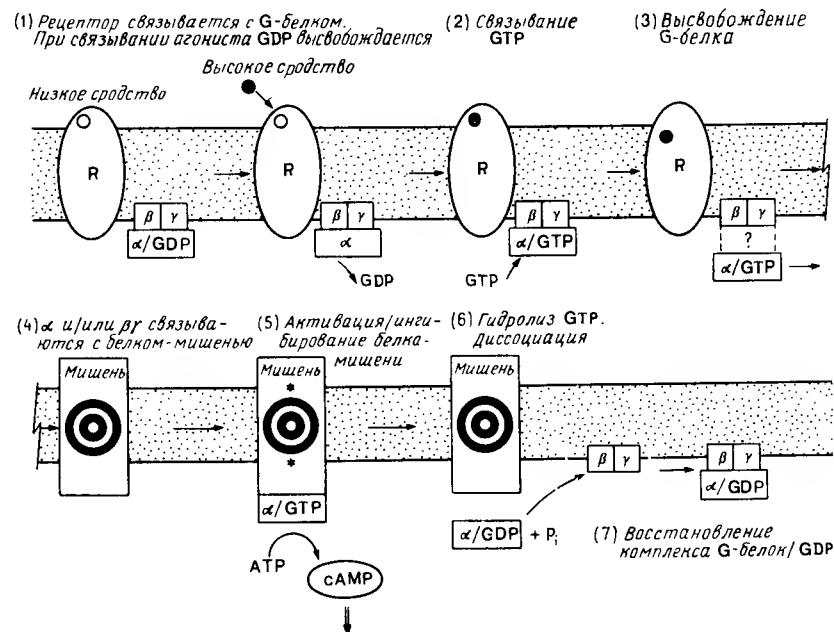


Рис. 9.15. Эффекты, индуцируемые агонистом в белке-мишени при участии G-белка. Примером может служить β -адренергический рецептор (R), сопряженный с аденилатциклазой (мишень) с помощью специфического G-белка (G_i), который состоит из трех субъединиц ($\alpha\beta\gamma$). (Черный кружок — агонист.) Детали см. в тексте.

Таблица 9.3. Функции и свойства G-белков [228, 525, 1400]

	G ₃ (очищ.)	G _i (очищ.)	G _i (очищ.)	G ₀ (очищ.) ²⁾	G _p (предпол.) ²⁾	G _k -(предпол.) ²⁾
Реперторный белок(ки) ¹⁾	β-Адренергические ре- цепторы (β ₁ , β ₂)	α ₂ -Адренергический ре- цептор Мускариновый холинергический ре- цептор A ₁ -аденозиновый ре- цептор D ₂ -дофаминовый ре- цептор Опиатный ре- цептор	Родопсин	Опиатный ре- цептор (мозг)	Мускариновый холинергический ре- цептор α ₁ -Адренергический ре- цептор Вазопрессинный ре- цептор Ангиотензиновый ре- цептор IgE-ре- цептор с вы- соким сродст- вом	Мускариновый холинергический ре- цептор Дофаминовый ре- цептор Гистаминовый ре- цептор
Белок(ки)-мишень(и)	Аденилат- циклаза	Аденилат- циклаза	cGMP-специ- фичная фос- фодиэстераза Фосфолипаза A2	Потенциал- зависимый Ca ²⁺ -канал	Фосфатидил- нозитол- специфичная фосфолипа- за C	K ₄ -канал (?)
Функция	Стимуля- ция	Ингибиро- вание	Стимуля- ция	Закрывание канала	Стимуля- ция	Открытие канала
Мол. масса субъединиц						
α	45 000 и 52 000	41 000	39 000	39 000	Неизвестна	Неизвестна
β	35 000 и 36 000	35 000 и 36 000	36 000	35 000 и 36 000		
γ	8 000	8 000	8 000	8 000		
Чувствитель- ность к ток- сину	Холерный токсин	Коклюшный токсин	Коклюшный и холерный токсины	Коклюшный токсин(?)		

¹⁾ Для указанных гормонов и нейромедиаторов может существовать более одного репертора. Этот список не является исчерпывающим.²⁾ Некоторые из этих выводов чисто спекулятивны. Функция G₀ и существование G_p и G_k пока четко не продемонстрированы. G_p, о котором здесь идет речь, не соответствует белку, выделенному из плацентарных мембран [401]. Возможно, G_k является одним из вариантов G_i.

дают GTPазной активностью при отсоединении от $\beta\gamma$ -субъединичной пары. α -Субъединица также содержит сайт, по которому может происходить ADP-рибозилирование бактеральными экзотоксинами. G_i , G_o и G_t (трансдуцин) модифицируются коклюшным токсином, а G_s и G_t — холерным токсином. Эта ковалентная модификация блокирует фосфорилирование G-белка и служит одним из тестов на участие G-белков в качестве интермедиатов в клеточных ответах. Заметим, что модификации холерным и коклюшным токсинами оказывают существенно разные эффекты. Модификация холерным токсином приводит к непрерывной активации G_s в присутствии АТР, а коклюшный разъединяет G_i , G_o , G_t и рецептор, необходимый для их активации.

G-белки могут стимулироваться в отсутствие гормона при добавлении в цитозоль негидролизуемого аналога GTP — GTP γ S, который связывается α -субъединицей. Это служит вторым тестом на участие G-белков в физиологическом ответе [1400]. Стимулировать G-белок может и добавление фторида; по-видимому, при этом образуется фторалюминатный комплекс со следовыми количествами алюминия. Этот ион, Al(F) $_4^-$, связывается с комплексом G-белок/GDP и активирует его, по-видимому, так же, как аналог γ -фосфата GTP [97].

Все G-белки прочно связаны с плазматической мембраной, за исключением трансдуцина, который *in vitro* может легко отсоединяться от мембраны. По крайней мере в двух случаях — для G_i и G_o — было показано, что для прочного прикрепления α -субъединиц к мембране необходимо присутствие $\beta\gamma$ -пары (см. рис. 9.15) [1389]. Ни одна из субъединиц не является трансмембранным белком. Однако по меньшей мере в некоторых случаях α -субъединица ацилирована (табл. 3.8) и может присоединяться к мембране с помощью ковалентно связанной жирной кислоты. Присоединение к рецептору гормона или нейромедиатора (или световая активация родопсина) ускоряет быстрый обмен GDP, связанного с α -субъединицей, с GTP. G-белок отсоединяется от рецептора, и в конечном счете α -субъединица отсоединяется от $\beta\gamma$ -пары. G-белок или отсоединившиеся α - либо $\beta\gamma$ -субъединицы диффундируют в плоскости мембраны или через цитоплазму к мишени(ям). Способы связывания субъединиц G-белка с мембраной и с их партнерами-мишенями или рецептором точно не известны [196]. Однако установлено, что после отсоединения α - и $\beta\gamma$ -субъединицы могут обладать разными функциями; так, в случае трансдуцина α -субъединица стимулирует фосфодиэстеразу, а $\beta\gamma$ -субъединицы — фосфолипазу A $_2$ [704].

С функциональной точки зрения ключевыми пунктами рассматриваемой системы является то, что она обеспечивает амплификацию, а также ограничивает время ответа. Занятый рецептор может активировать много G-белков. Например, каждая активированная

светом молекула родопсина может активировать около 500 молекул G_t . Каждая из них активирует молекулу фосфодиэстеразы, которая за время жизни в активированном состоянии гидролизует 1000 молекул cGMP. Следовательно, амплификация достигает 10^6 . В случае родопсиновой системы уменьшение концентрации cGMP в цитоплазме приводит к закрыванию cGMP-зависимого K $^+$ -канала, что сопровождается гиперполяризацией плазматической мембраны и генерацией нервного импульса [43]. α -Субъединица гидролизует связанный GTP за считанные секунды и затем возвращается к занятому рецептору, чтобы вновь активироваться; следовательно, контроль за продолжительностью ответа может осуществляться на уровне рецептора, и были выявлены многочисленные механизмы, с помощью которых происходит «десенситилизация» рецепторов.

Первый G-белок (трансдуцин) был выделен из родопсинсвязанной системы, где он присутствует в относительном избытке. Установлено, что G-белки повсеместно используются для передачи информации о том, что рецептор занят, на специфическую внутриклеточную систему амплификации сигнала. По-видимому, в будущем будут обнаружены другие G-белки и достигнуты новые успехи в определении их специфичности, особенно в случае, когда одна клетка содержит разные G-белки.

9.7.3. ОБНОВЛЕНИЕ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛА И ВТОРЫЕ ПОСРЕДНИКИ [907, 1124, 908, 80, 94]

Наиболее широко распространенными мишенями G-белков являются аденилатциклаза (для G_s и G_i) и фосфолипаза C, ответственная за гидролиз фосфатидилинозитола (для G_p). Модуляция аденилатциклазы приводит к изменению внутриклеточной концентрации cAMP, который, как известно, служит вторым посредником, влияя на множество внутриклеточных процессов. Одним из последствий увеличения содержания cAMP является, например, стимуляция cAMP-зависимой протеинкиназы (протеинкиназа A), которая в свою очередь фосфорилирует специфические белковые субстраты [239]. Клетки содержат также два типа Ca $^{2+}$ -зависимых протеинкиназ, активируемых соответственно Ca $^{2+}$ -кальмодулином и Ca $^{2+}$ вместе с диацилглицеролом и фосфатидилсеринном (протеинкиназа C). Активность обеих этих киназ регулируется вторыми посредниками, образующимися при деградации фосфатидилинозитола, которая во многих клетках инициируется путем G-белокзависимой активации специфической фосфолипазы C. Установление механизма обновления фосфатидилинозитола и физиологической роли продуктов его деградации явилось главным достижением в выяснении роли

гормонов и нейромедиаторов в осуществлении клетками их функций.

На долю фосфатидилинозитола (PI) приходится лишь 2—8% всех фосфолипидов, содержащихся в клеточных мембранах эукариот [908]. Структура его полярной головки представлена на рис. 9.16. Этот стереоизомер называют миоинозитолом, поскольку впервые он был выделен из мышц (гомогената). Небольшая часть фосфатидилинозитола фосфорилирована по положению 4 или по положениям 4 и 5. От 1 до 10% фосфатидилинозитола, присутствующего в мембране, приходится на долю фосфатидилинозитол(4,5)-бисфосфата, обозначаемого как PIP_2 или $PI(4,5)P_2$. Этот компонент является, вероятно, первой мишенью для фосфатидилинозитолспецифичной фосфолипазы C, которая активируется во многих клетках G-белком. Последующий гидролиз приводит к быстрому распаду фосфатидилинозитола в плазматической мембране и кратковременному возрастанию количества продуктов распада. Например, во время активации тромбоцитов за 90 с деградирует половина общего пула фосфатидилинозитола [908]. Продукты распада действуют как вторые посредники и участвуют во многих клеточных процессах. Исследование этой системы еще не закончено, но общая ее схема уже построена и представлена на рис. 9.16. Последовательность событий такова.

1. Начальными продуктами гидролиза PIP_2 являются диацилглицерол и инозитол(1,4,5)трисфосфат [$I(1,4,5)P_3$]. Диацилглицерол связан с мембраной, а $I(1,4,5)P_3$ является растворимым компонентом. Обычно жирные кислоты фосфатидилинозитола представлены стеариновой кислотой в положении 1 и арахидоновой кислотой в положении 2 глицерола. Из мозга быка были выделены две разные фосфатидилинозитолспецифичные фосфолипазы C [1266, 1204], но данные об их активации G-белком *in vitro* отсутствуют.

2. $I(1,4,5)P_3$ служит вторым посредником, и его основной функцией, по-видимому, является мобилизация Ca^{2+} , аккумулированного в эндоплазматическом ретикулуме. Возможно, этот компонент путем прямого связывания открывает Ca^{2+} -специфичные каналы в эндоплазматическом ретикулуме, что приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме в несколько раз. Обычно концентрация свободного Ca^{2+} в цитоплазме составляет 0,1 мкМ.

3. Специфическая киназа превращает некоторое количество $I(1,4,5)P_3$ в тетрафосфорилированный продукт $I(1,3,4,5)P_4$ [657]. Образуются также другие, в том числе циклические, фосфоинозитиды, и некоторые из них тоже имеют физиологическое значение [908].

4. Одним из ферментов, регулируемых Ca^{2+} , является фосфолипаза C, которая при низкой концентрации Ca^{2+} использует в качестве субстрата преимущественно PIP_2 , но при более высокой концентрации Ca^{2+} , по крайней мере *in vitro*, использует нефосфорили-

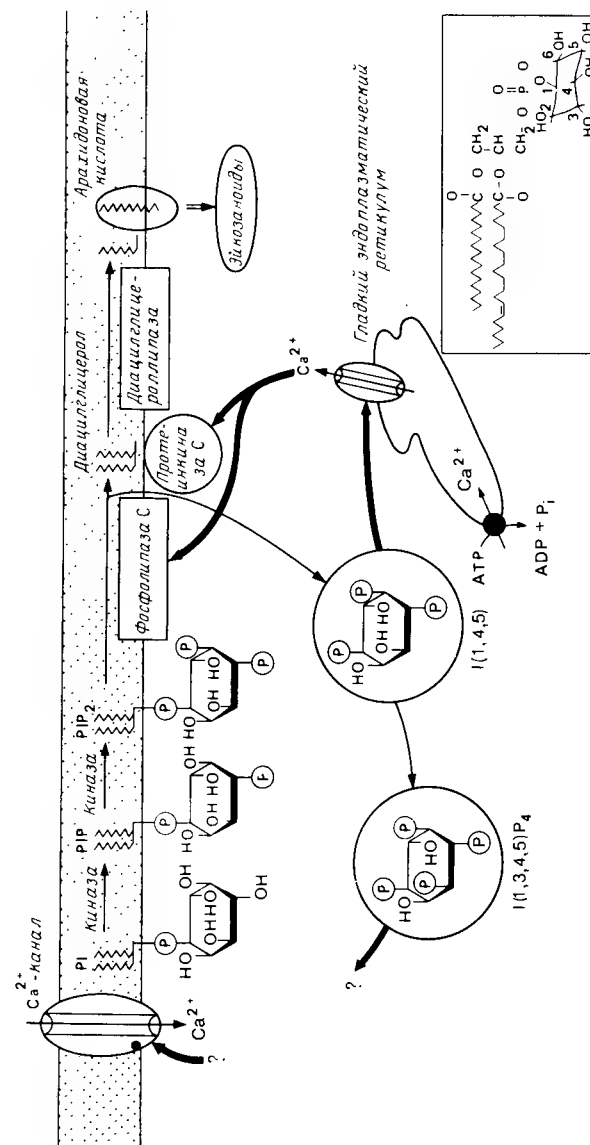


Рис. 9.16. Образование вторых посредников в результате распада фосфатидилинозитола (PI), индустрированного агонистом. Во многих клетках система активируется G-белком, который стимулирует PI-специфичную фосфолипазу C. Известно, что IP_3 вызывает мобилизацию Ca^{2+} , сосредоточенного в эндоплазматическом ретикулуме; возможно, IP_3 и IP_4 способствуют проникновению Ca^{2+} в клетку через плазматическую мембрану. Внизу справа приведена структурная формула типичных PI, обогащенных стеаратом (*sn-1*) и арахидонатом (*sn-2*). Детали см. в тексте

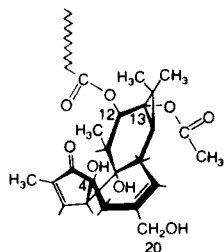


Рис. 9.17. Структура наиболее сильнодействующего форболового диэфира (агента, ускоряющего опухолеобразование) 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата [50]. Это соединение действует как аналог диацилглицерола, связываясь с протеинкиназой С и активируя ее.

рованный фосфатидилинозитол. Возможно, это облегчает непосредственный быстрый гидролиз основной части фосфатидилинозитола, но так ли это — неясно [908].

5. Наиболее важным ферментом, активируемым Ca^{2+} , является протеинкиназа С (см. разд. 6.7.1). Этот фермент локализован преимущественно в цитозоле до момента появления там диацилглицерола и Ca^{2+} . Затем в зависимости от присутствия фосфатидилсерина он связывается с плазматической мембраной и активируется [80]. Эффекты, сходные с действием диацилглицерола, оказывают форболовые эфиры (рис. 9.17), и протеинкиназу С часто рассматривают как рецептор этих соединений [50]. Одним из признаков участия протеинкиназы С и фосфоинозитидной системы в клеточном ответе на присутствие агониста является дублирование эффектов агониста путем добавления форболовых эфиров, которые непосредственно активируют протеинкиназу С [50].

В активированном состоянии протеинкиназа С является серин- и треонинспецифичной протеинкиназой, которая фосфорилирует как специфические мишени, так и саму себя [1063]. Природа такой субстратной специфичности и физиологические последствия фосфорилирования белков точно не известны. Однако с помощью молекулярного клонирования удалось установить, что существует семейство протеинкиназ С (например, известны три их вида, выделенные из мозга кролика) [186]. Возможно, они обладают разной специфичностью, как и семейство G-белков.

Механизм регуляции работы протеинкиназы С неизвестен; установлено лишь, что ганглиозиды [786] и лизосфинголипиды [587] ингибируют этот фермент, а кроме того, выделен его ингибитор белковой природы [892].

6. Диацилглицерол может подвергаться дальнейшей деградации под действием диацилглицероллипазы до арахидоновой кислоты, которая окисляется до множества биологически активных метаболитов, называемых эйкозаноидами и включающих простагландины.

Хотя арахидоновая кислота сама является вторым посредником [1167], неясно, насколько существен для ее образования фосфатидилинозитолспецифичный, зависящий от фосфолипазы С путь. С другой стороны, арахидоновая кислота может образовываться из множества фосфолипидов при действии фосфолипазы A_2 . В нескольких типах клеток путь биосинтеза с участием фосфолипазы A_2 более важен [163, 317].

Итак, суммируя сказанное выше, можно утверждать, что при функционировании рассмотренной сложной системы образуются по меньшей мере три известных вторых посредника: диацилглицерол, IP_3 и арахидоновая кислота. Каждый из них выполняет специфические функции, включая увеличение содержания внутриклеточного Ca^{2+} и активацию Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ. Эта система распространена весьма широко, но детали механизма воздействия с ее помощью на специфические клеточные функции пока неясны.

9.7.4. ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ И ДЕСЕНСИБИЛИЗАЦИЯ [1340]

Физиологический ответ на действие гормона или нейромедиатора обычно является кратковременным даже при постоянном присутствии агониста. Это явление называется десенситизацией и характерно для многих систем ответа как у эукариот, так и у прокариот. Как мы уже говорили в разд. 9.6, десенситизация системы хемотаксиса *E. coli* частично обусловлена ковалентной модификацией рецепторов путем метилирования. В животных клетках решающую роль в десенситизации играет фосфорилирование рецепторов.

Индуктируемая лигандом десенситизация может рассматриваться в двух вариантах. *Гомологичная десенситизация* происходит тогда, когда ослабляется ответ на специфический агонист, но ответ на другие агонисты, действующие через разные рецепторы, остается без изменения. *Гетерологичная десенситизация* наблюдается в случае, когда применение одного агониста ослабляет ответ клетки на многочисленные агонисты, действующие через различные рецепторы. В обоих случаях происходит фосфорилирование в основном рецепторных белков. В этих реакциях участвуют две киназы — протеинкиназа С и cAMP-зависимая протеинкиназа, называемая также протеинкиназой А. Кроме того, рецепторы (например, родопсин и β -адренергические рецепторы) могут модифицироваться под действием рецепторспецифичных киназ; протекают также реакции аутофосфорилирования, катализируемые теми рецепторами, которые представляют собой тирозиновые протеинкиназы.

В основе гетерологичной десенситизации лежит классическая регуляция по типу обратной связи. Агонисты, стимулирующие аденлатциклазы (например, простагландин E_1 , действующий через β -адренергический рецептор), активируют протеинкиназу А, которая в свою очередь фосфорилирует рецептор и вызывает его десенситизацию. Например, фосфорилированный β -адренергический рецептор обладает меньшей способностью активировать G_s -белок. Аналогичным образом агонисты, стимулирующие фосфатидилинозитольную систему, активируют протеинкиназу С, которая фосфорилирует рецептор и ослабляет ответ. В качестве примера можно привести α_1 -адренергический рецептор. Не исключено также, что рецепторы, связанные с фосфатидилинозитольной системой, модулируются протеинкиназой А, стимулированной сАМР. Примером такого рода является мускариновый ацетилхолиновый рецептор [166].

Гомологичная десенситизация была описана для β -адренергических рецепторов и включает фосфорилирование рецепторов с помощью рецепторспецифичной киназы. Эта киназа фосфорилирует только комплекс рецептор/агонист, в результате чего происходит интернализация фосфорилированного рецептора путем эндоцитоза. В эндоцитозных везикулах находится фосфатаза, которая отщепляет фосфатную группу(ы) и регенерирует активную форму рецептора, возвращающегося к плазматической мембране. Аналогичная киназа была описана для «светового» рецептора родопсина, где субстратом является его обесцвеченная форма.

Одним из сигналов для интернализации рецепторов может быть фосфорилирование по специфичным сайтам. Например, фосфорилирование рецептора ФРЭ протеинкиназой С приводит к его интернализации. Этот процесс блокируется замещением остатка специфичного треонина (номер 654) на остаток аланина с помощью сайтспецифического мутагенеза. Однако ФРЭ-стимулируемая интернализация рецептора не прекращается, что указывает на множественность сигналов интернализации. Как мы уже говорили, фоболовые эфиры вызывают фосфорилирование и интернализацию трансферринового рецептора [673, 943].

Интернализация не является единственным механизмом, с помощью которого фосфорилирование ослабляет рецепторный ответ. Активность рецептора, локализованного в плазматической мембране, тоже может регулироваться. Например, фосфорилированный рецептор ФРЭ обладает меньшей тирозинкиназной активностью, а также меньшим сродством к агонисту ФРЭ. Фосфорилированный мускариновый ацетилхолиновый рецептор также дезактивируется в плазматической мембране [166].

Реакции аутофосфорилирования рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью, как правило, являются стимуляторными.

Это было показано для инсулинового рецептора, при аутофосфорилировании которого увеличивалась его способность фосфорилировать другие белки, а рецепторная активность становилась независимой от инсулина. С помощью мутагенеза было показано участие в регуляции этих эффектов специфических остатков тирозина, локализованных в цитоплазматическом домене β -субъединицы.

9.7.5. НЕКОТОРЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, ПРИНИМАЮЩИЕ УЧАСТИЕ В ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛОВ В ЖИВОТНЫХ КЛЕТКАХ

В этом разделе мы остановимся на некоторых наиболее важных особенностях трех типичных систем передачи сигнала в животных клетках. Эти системы относительно хорошо изучены и иллюстрируют интересные особенности механизма ответа животных клеток на внешние раздражители. Основной особенностью является то, что центральную роль в изменении ионных токов играют протеинкиназы.

Рецептор фактора роста эпидермиса [187]

Фактор роста эпидермиса является сильнодействующим митогенным белком, который связывается со специфическим рецептором, находящимся на поверхности различных эпителиальных, эпидермальных и фибробластных клеток. Рецептор представляет собой один гликозилированный полипептид с мол. массой около 170 кДа и относится к семейству митогенных рецепторов [187] (рис. 9.14). Его N-концевая часть расположена вне клетки и является ФРЭ-связывающим доменом. Рецептор имеет единственный мембранный сегмент и большой внутриклеточный домен, обладающий тирозинкиназной активностью. ФРЭ-рецептор, как и другие рецепторные белки, содержит внеклеточные домены, богатые цистеином, но их функция неизвестна.

ФРЭ-рецептор находится на плазматической мембране в высокоаффинной и низкоаффинной формах. Возможно, это связано с существованием в мембране различных состояний ассоциации этого белка (мономер/димер). Показано, что связывание с ФРЭ стабилизирует димерную форму очищенного рецептора в детергенте; это указывает на важность агрегации рецептора для передачи сигнала [1614, 120]. Биохимические исследования показывают, что связывание с ФРЭ индуцирует тирозинкиназную активность, в частности аутофосфорилирование рецептора, по нескольким остаткам тирозина в цитоплазматическом домене. Как связаны между собой киназная активность и клеточный ответ, неясно [1185, 867]. В некоторых типах клеток существует какой-то независимый механизм, с помощью которого ФРЭ влияет на фосфатидилинозитольную систе-

му, возможно, путем стимулирования фермента, фосфорилирующего фосфатидилинозитол с образованием монофосфорилированного производного [1158].

В предыдущем разделе уже отмечалось, что рецептор ФРЭ фосфорилируется протеинкиназой C, которая десенсибилизирует рецептор и индуцирует его поглощение путем эндоцитоза [1340]. Одним из ранних событий, связанных с ФРЭ-стимуляцией клеток, является активация Na^+/H^+ -антипортера в плазматической мембране. Это приводит к замене внутриклеточного H^+ на внеклеточный Na^+ и к незначительному повышению pH [1246]. Это ранний ответ на многие митогенные агенты [1258], и изменения pH может быть достаточно для индукции активности других клеточных ферментов. Митогенный ответ, т. е. индукция синтеза ДНК, является длительным ответом, требующим присутствия ФРЭ во внешней среде в течение нескольких часов [1185]. Механизм этого явления остается непонятным.

ФРЭ-рецептор поглощается путем рецепторзависимого эндоцитоза, как описано в разд. 9.5. Исходно рецепторы распределены в плазматической мембране случайным образом, но при связывании ФРЭ комплекс рецептор/ФРЭ концентрируется в окаймленных ямках, поглощается и попадает в лизосому, где происходит его деградация [357]. Это очищает поверхность с эффективностью примерно 80% рецепторов за 20 мин. Латеральная подвижность рецептора, измеренная с помощью метода FRAP (разд. 5.4), составила $1,5 \cdot 10^{-10} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, что указывает на существование каких-то препятствий при его латеральном движении. Мутанты, у которых отсутствует большая часть цитоплазматического домена, тоже диффундируют медленно, из чего следует, что этот домен не связан с уменьшением латеральной подвижности [866]. Возможно, для этого важны взаимодействия с компонентами внеклеточного матрикса. Однако цитоплазматический домен необходим для эндоцитоза [868, 1185], как и у других рецепторов. Делеция 63 аминокислотных остатков с C-конца приводит к потере рецептором сайта аутофосфорилирования и высокого сродства к ФРЭ. Тем не менее этот рецептор остается способным к эндоцитозу и обладает митогенными свойствами [868].

Мутагенез очень полезен для выяснения механизма функционирования рецепторов, но важным фактором, который пока не удалось выяснить, является степень ассоциации рецептора в мембране. Это особенно интересно для тех рецепторов, которые имеют единственный спиральный трансмембранный сегмент, с точки зрения передачи конформационного изменения во внеклеточном агонист-связывающем домене к внутриклеточному тирозинкиназному домену через единственную спираль. Вряд ли связывание ФРЭ изменяет геометрию спирали; спираль не может также «скользить» вдоль

другой спирали внутри трансмембранного домена, если рецептор имеет один трансмембранный сегмент. Возможно, связывание ФРЭ изменяет белково-липидные взаимодействия, благодаря которым спираль может проталкиваться через бислой. Другая возможность — изменение степени агрегации рецепторов при связывании с ФРЭ; об этом свидетельствует изучение выделенных белков [1614, 120].

β-Адренергический рецептор [342]

Многие важные особенности β-адренергических рецепторов мы уже обсуждали. Несколько таких рецепторов было клонировано (в том числе рецепторы клеток хомяка, человека и индюка); при этом было показано, что они структурно сходны с семейством опсинов, в том числе родопсином, и с мускариновыми холинергическими рецепторами ([342]; табл. 9.1). По-видимому, все эти белки имеют по семь трансмембранных спиралей [341]; экспериментальное подтверждение этому было получено для родопсина (рис. 4.1). Консервативные остатки этих рецепторов локализованы главным образом в гидрофобных областях, а не в гидрофильных петлях, соединяющих трансмембранные сегменты. Среди этих консервативных остатков в трансмембранных сегментах находится несколько полярных остатков. Заметим, что эти белки негомологичны бактериородопсину.

Ретинальсвязывающий сайт родопсина находится в гидрофобном ядре, образуя шиповое основание с остатком лизина в спирали VII (рис. 4.1). Было бы заманчиво предположить, что агонистсвязывающий сайт в β-адренергическом рецепторе также локализован в гидрофобном ядре. Для проверки этого предположения был проведен сайт-специфический мутагенез β-адренергического рецептора хомяка [1396, 388, 339]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидрофильные петли несут существенные для связывания агониста или антагониста, а также показывают, что для связывания агониста необходим остаток аспартата в положении 113, находящийся в спирали III. Не являются неожиданностью полученные в этих работах данные о том, что, вероятно, гидрофильная петля участвует во взаимодействии с G-белком [1397].

IgE-рецептор мастоцитов и базофилов

Мастоциты и базофилы содержат секреторные гранулы, наполненные гистамином. При соответствующей стимуляции эти экзоцитозные везикулы сливаются с плазматической мембраной и высвобождают запасенный гистамин [1632]. Показано, что этот процесс

запускается агрегацией IgE-рецепторов клеточной поверхности, которая индуцируется связыванием либо с IgE, либо с другими лигандами, сшивающими рецепторы. IgE-система представляет особый интерес, поскольку для нее действительно показана роль агрегации рецепторов в передаче сигнала [973, 972], а кроме того, она является примером системы, связанной с деградацией фосфатидилинозитола, которая инициируется G-белком [65, 1054].

IgE-рецептор представляет собой $\alpha\beta\gamma_2$ -тетрамер; он был очищен [1222], а ген α -субъединицы — клонирован и секвенирован [754]. Эта субъединица гомологична Fc-рецептору IgG [1202], который относится к иммуноглобулиновому суперсемейству (табл. 9.1). В отсутствие сшивающего лиганда IgE-рецепторы распределены в мембране равномерно (10^3 рецепторов на 1 см^2) и обладают ограниченной подвижностью (коэффициент латеральной диффузии равен примерно $3 \cdot 10^{-10}\text{ см}^2/\text{с}$). Каждый рецептор может связать одну молекулу IgE, и ответ возникает только под действием мультимерных форм IgE, которые способны связывать несколько рецепторов одновременно. Олигомеры, содержащие лишь несколько молекул IgE, вызывают быструю иммобилизацию рецепторных кластеров, которая, по-видимому, осуществляется благодаря последовательным взаимодействиям с элементами цитоскелета и не может определяться простой гидродинамикой [973]. В результате всех этих событий запускается клеточный ответ, при котором образуются фосфоинозитиды и арахидоновая кислота, мобилизация Ca^{2+} и секреция гистамина [65, 1054, 1177]. Этот ответ ингибируется коклюшным токсином, по-видимому, при участии G-белка.

9.8. Онкогены и передача сигнала [1036, 1563, 101, 102, 350].

Рецепторы и механизм передачи сигнала, описанные в предыдущем разделе, играют существенную роль в регуляции клеточного роста и дифференцировки. Те же факторы, как показывают молекулярно-генетические исследования, участвуют в процессах перерождения опухолей. Наилучшими экспериментальными моделями явились онкогены ретровирусов [101]. Было показано, что за опухолевую трансформацию инфицированных клеток отвечают 20 разных ретровирусных генов, называемых онкогенами. Эти онкогены в большинстве случаев имеют клеточные аналоги. Например, белок, кодируемый вирусным онкогеном *v-erbB*, является укороченным вариантом ФРЭ-рецептора (рис. 9.14). В этом случае вирусный онкоген родствен клеточному гену, кодирующему ФРЭ-рецептор. Такие клеточные гены называются протоонкогенами. Используя способность онкогенов трансформировать клетки в культуре [102], уда-

лось выделить их также из ДНК опухолевых клеток. Онкогены появляются в результате генетических повреждений в протоонкогенах. Около половины протоонкогенов, идентифицированных по гомологии с вирусными онкогенами, тоже были выявлены при изучении опухолей. Однозначной корреляции между видом онкогена и возникающей опухолью или характером нарушения функционирования клетки не обнаружено. Существует гипотеза, что протоонкогены кодируют белки, которые участвуют в передаче сигнала, опосредуемой мембранами, или являются мишенями для вторых посредников [102, 1563].

Продукты некоторых идентифицированных онкогенов обладают тирозинспецифичной протеинкиназной активностью и являются аналогами мембранных рецепторов для митогенных пептидов и гормонов роста. Сверхэкспрессия онкогена, изменение специфичности для белковых субстратов или изменение регуляции активности могут приводить к патологии. Протоонкоген может превратиться в онкоген в результате простых точечных мутаций. Продукты не всех онкогенов, обладающие тирозинкиназной активностью, являются трансмембранными белками, некоторые из них представляют собой периферические мембранные белки [101].

Онкогенные белки типа *v-ras* гомологичны α -субъединице G-белков. Соответствующие гены представляют собой модификации гена, кодирующего G-белок, который стимулирует фосфатидилинозитольную систему. Показано, что введение этих онкогенов в геном приводит к повышению уровня диацилглицерола, хотя содержание растворимых фосфоинозитидов при этом не увеличивается [1603]. Как это связано с трансформацией — неизвестно. Отметим, что форболовые эфиры ускоряют образование опухолей, и эта функция, вероятно, связана с активацией протеинкиназы C.

Наиболее существенно то, что нарушение аппарата передачи сигнала может индуцировать рак. Изучение этой закономерности может оказаться полезным не только для установления механизмов возникновения опухолей, но и для выявления сложной сети взаимодействий в системе передачи сигнала, ответственной за нормальную клеточную пролиферацию и дифференцировку.

9.9. Резюме

Взаимодействия клетки с ее окружением осуществляются при участии рецепторов, расположенных на ее поверхности. Функции этих рецепторов существенно различаются. Одни из них определяют адгезивные свойства клеток по отношению к другим клеткам или компонентам внеклеточного матрикса. Другие участвуют в системах сигнал/ответ или в импорте макромолекул в цитоплазму.

Сравнение аминокислотной последовательности рецепторов показывает, что многие из них могут быть сгруппированы в суперсемейства структурно родственных, но функционально различающихся белков. Например, многие рецепторы, участвующие в межклеточной адгезии, принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов IgG. Интегрины составляют другое суперсемейство, включающее в себя множество рецепторов для внеклеточных компонентов матрикса.

Рецептор, который связывается с таким внеклеточным лигандом, как гормон или нейромедиатор, и опосредует клеточный ответ, осуществляет это одним из нескольких способов. В одних случаях рецептор сам является протеинкиназой, а в других он образует ионный канал. Связывание лиганда с внеклеточным участком рецептора изменяет эти функции, инициируя каскад событий в цитоплазме. В других случаях рецептор связывается с гуанидиннуклеотидсвязывающим белком (G-белком) и активирует его в цитоплазме в ответ на внешний сигнал. G-белок влияет на другие клеточные процессы, такие, как деградация фосфатидилнозитола в клеточной плазматической мембране. Рецепторы, которые взаимодействуют с G-белками, образуют одно из нескольких суперсемейств рецепторов, участвующих в системах сигнал/ответ.

Важно помнить, что поверхность животной клетки очень динамична и плазматическая мембрана участвует в удивительном явлении, называемом рециклированием мембран. Внутриклеточные везикулы постоянно сливаются с плазматической мембраной, а участки плазматической мембраны в свою очередь отшнуровываются с образованием внутриклеточных везикул. Эти процессы составляют часть эндоцитозного и экзоцитозного путей.

БИОГЕНЕЗ МЕМБРАН

10.1. Введение

В этой главе мы рассмотрим процесс образования мембран. Этот процесс начинается с синтеза белковых и липидных компонентов, которые затем должны быть доставлены к месту назначения. Принимая во внимание все разнообразие мембран, существующих в типичной эукариотической клетке, можно сделать вывод, что для осуществления этого процесса необходимы необычайно точные механизмы.

В первой части этой главы мы обсудим вопросы биогенеза мембранных белков. В принципе имеются две главные проблемы, касающиеся сборки мембранных белков.

1. Все закодированные в ядре белки синтезируются общим путем рибосом. В связи с этим возникает вопрос: как отдельные мембранные белки доставляются к месту назначения? Чем отличаются белки плазматической мембраны от белков внутренней митохондриальной мембраны или от белков мембран эндоплазматического ретикулума? Эту сложную проблему сортировки можно решить только при наличии определенных сигнальных последовательностей в каждом полипептиде, а также соответствующего аппарата узнавания.

2. Каков истинный механизм встраивания мембранных белков в мембрану и как при этом достигается правильная их ориентация относительно мембранного бислоя? Требуют ли механизмы встраивания и ориентации также наличия определенных сигнальных элементов и систем узнавания и если да, то каковы они? Какие свойства обеспечивают при встраивании мембранных белков формирование правильной третичной, а также четвертичной структуры в случае мультисубъединичных ансамблей?

За последнее десятилетие в поиске ответов на все эти вопросы достигнуты большие успехи, причем они становятся все более значительными. Это в большой мере обусловлено тем, что для выяснения роли специфических сигнальных полипептидных последовательностей в этих процессах стала использоваться рекомбинантная ДНК. Хотя не на все вопросы удалось найти ответы, полученные

результаты все больше убеждают в том, что совершенно разные на первый взгляд системы в действительности обладают фундаментальным сходством. Например, не так давно [1268] было показано, что механизм секреции белков имеет много общего с механизмом синтеза белков плазматической мембраны. Совсем недавно достигнут большой прогресс в понимании общих принципов переноса белков через мембраны митохондрий, эндоплазматического ретикула и грамотрицательных бактерий [1576, 1136, 1288]. Эти экспериментальные системы изучались наиболее интенсивно. И хотя между соответствующими процессами есть значительные различия, они имеют ряд общих особенностей.

1. Существует идентифицируемая часть полипептидной последовательности, которая служит участком узнавания, или «сигналом», направляющим отдельный полипептид к мембране, в которую он встраивается. Эти сигнальные участки часто расположены на N-конце новосинтезированного полипептида и отщепляются специфическими сигнальными пептидазами после встраивания его в нужную мембрану или переноса через нее. Для обозначения N-концевого сигнала различными авторами использовались следующие термины: *сигнальный пептид*, *сигнальная последовательность*, *транзитный пептид*, *лидирующий пептид*, *пре-последовательность*.

2. Процессы трансляции и встраивания белков в мембрану можно разделить в эксперименте. Для сборки мембранных белков в большинстве случаев необходима энергия, отличающаяся по величине от той, которая требуется для их трансляции на рибосоме. Замечено, что *in vivo* трансляция и перенос часто бывают тесно сопряжены во времени.

3. Связавшийся с мембраной-мишенью полипептид должен, кроме того, находиться в конформации, в которой может осуществляться его перенос через мембрану или встраивание в нее. Во многих случаях перенос белков через мембраны происходит от N-конца к C-концу, при этом необходимо, чтобы белок был по крайней мере частично развернут или слабо свернут. Полипептид может транслонироваться в вытянутой форме в ходе энергозависимого процесса [1252].

Первая группа вопросов, которые мы рассмотрим, связана с сортировкой белков во время биогенеза и сборки. На рис. 10.1 представлена схема, иллюстрирующая всю сложность этой проблемы и суммирующая данные по эукариотическим клеткам и грамотрицательным бактериям. Доставка каждого белка к месту назначения обеспечивается иерархией сигналов, закодированных в каждом полипептиде. Например, большинство белков, предназначенных для эндоплазматического ретикула или митохондрий, синтезируется в виде предшественников большей молекулярной массы (пре-белков); на N-конце у них имеется дополнительная последователь-

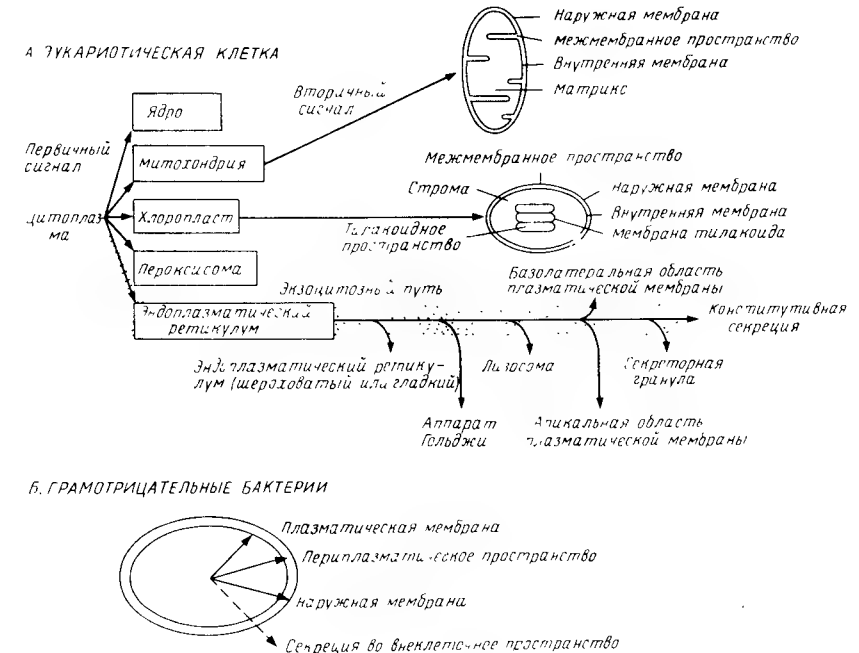


Рис. 10.1. Сортировка белков в клетках эукариот и грамотрицательных бактерий. Первичные сигналы сортировки направляют полипептид к нужной органелле и необходимы для транслокации. Вторичные сигналы определяют их окончательную локализацию. Показан экзоцитозный путь.

ность, которая отщепляется особыми протеолитическими ферментами, имеющимися в этих органеллах. Такие *первичные сигналы* весьма разнообразны и необходимы для того, чтобы полипептиды были узнаны при транслокации специфическими рецепторами в этих органеллах. Связывание с митохондриями происходит сразу после завершения трансляции. Однако для большинства белков, направляемых в эндоплазматический ретикулум в клетках млекопитающих, наблюдается иная картина. Как видно из рис. 10.1, после связывания белков с соответствующей органеллой должна произойти дальнейшая сортировка. Для этого нужна дополнительная информация, которая также должна быть закодирована в каждой полипептидной последовательности и может рассматриваться как *вторичные сигналы*. В нескольких случаях их удалось идентифицировать как сигнальные последовательности, физически отделенные от первичных, хотя, возможно, так бывает не всегда. Позже в этой

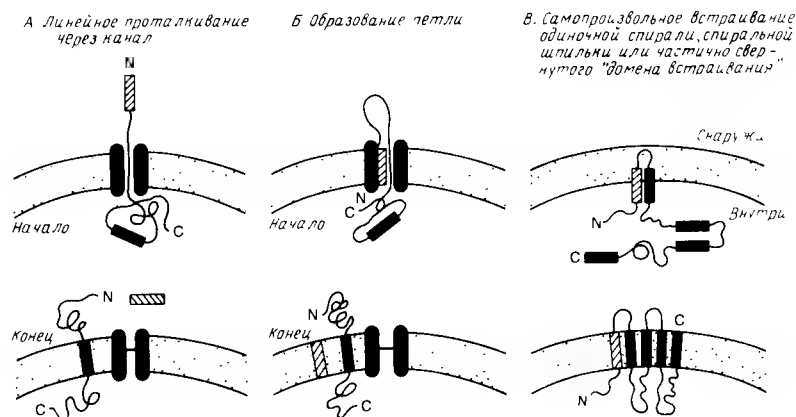


Рис. 10.2. Три общие модели возможной сборки белков в мембране. Две первые (А и Б) предполагают, что белок транспортируется в линейной форме через некий белковый канал. При наличии стоп-сигнала процесс останавливается, в противном случае через мембрану проходит весь белок. Модель В предполагает, что гидрофобные элементы полипептида самопроизвольно включают в липидный бислой. Гидрофобный элемент может представить собой одиночную спираль или более сложную структуру. Процесс может быть опосредован белками.

главе мы рассмотрим характерные примеры использования этих сигналов при сортировке белков.

Особый интерес для нас представляет процесс сборки мембранных белков, который целесообразно рассмотреть в связи с их сортировкой. На рис. 10.2 схематически показаны три общих механизма проникновения пептидного предшественника в мембрану. Механизмы А и Б являются вариантами схемы линейного вытеснения, согласно которой сигнальная последовательность направляет полипептид к переносному устройству, которое включает в себя заполненный водой канал. Сигнальная последовательность может проходить прямо сквозь канал (механизм А) или оставаться связанной с мембраной, образуя, как показано на рис. 10.2, петлю (механизм Б). В отсутствие какого-либо сигнала остановки процесса переноса полипептид будет транспортироваться через мембрану целиком. Однако, если внутри полипептида имеется второй сигнальный пептид, называемый *стоп-сигналом переноса*, то процесс останавливается и стоп-сигнал переноса становится трансмембранным сегментом зрелого мембранного белка. Фиксируя белок в мембране, стоп-сигнал переноса действует как сигнал сортировки [1491]. Если в белке имеются и другие сигналы начала и конца переноса, то будут образовываться следующие трансмембранные сегменты. Рис. 10.3 показывает, как сочетание нескольких видов сигналов может на-

правлять последовательность реакций таким образом, чтобы создавалось широкое разнообразие типов упаковки встраиваемых в мембрану белков эндоплазматического ретикулума. Заметим, что сигнальные последовательности, которые не удаляются протеолитическим путем, остаются в начале трансмембранных сегментов и могут использоваться для инициации транспорта фланкирующих полипептидных доменов на N- или С-конце. К сожалению, эта простая схема не является исчерпывающей, известны примеры, когда сигналы изменяют свою функцию в зависимости от обстоятельств [51, 1000] или когда в правильном включении в мембрану существенную роль играют взаимодействия между предполагаемыми сигналами внутри полипептида [365, 275].

Схема В на рис. 10.2 иллюстрирует возможную роль самопроизвольного включения в мембрану гидрофобных элементов полипептидного предшественника. Этот механизм может реализовываться только тогда, когда включение в мембрану происходит после трансляции полипептида. Первым примером, подтверждающим существование этого механизма, является пробелок оболочки фага М13 (разд. 10.3.1). Модель самопроизвольного включения может использоваться для объяснения механизма встраивания поперек мембраны амфифильных α -спиралей или β -структур. Этот процесс может также, конечно, быть белокзависимым.

В следующих двух разделах этой главы рассматривается экзоцитозный путь (см. ниже) в эукариотических клетках и обсуждается, как и где собираются и транспортируются внутри клетки мембранные белки. О координации биосинтеза мембранных липидов и белков в прокариотических или эукариотических клетках известно немного. Установлено, впрочем, что в нескольких случаях сверхпродукция отдельных мембранных белков приводит к разрастанию внутриклеточных мембран, содержащих липиды и в преобладающем количестве — сверхпродуктированный белок [1588, 383, 768]. Последняя часть этой главы посвящена биогенезу липидов. То обстоятельство, что липидный состав разнообразных мембран в эукариотической клетке существенно различается, позволяет задаться вопросом, как эти композиции липидов создаются и поддерживаются. Мы остановимся, в частности, на скорости обмена разных видов липидов между мембранами и возможных механизмах, облегчающих перенос липидов от места их синтеза к месту назначения. Наконец, известно, что липидный состав мембран многочисленных организмов варьирует при изменении внешних условий. Природа такого адаптивного ответа в связи с биогенезом мембранных липидов обсуждается в последнем разделе.

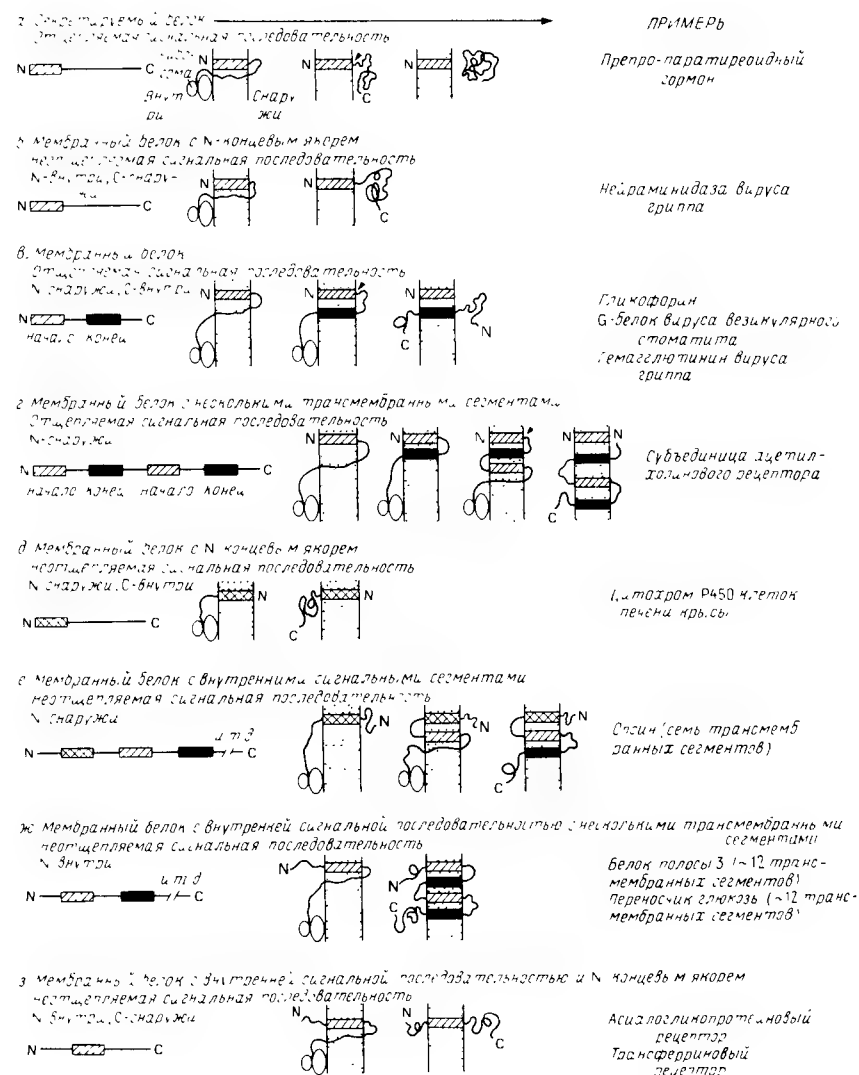


Рис. 10.3. Модели, иллюстрирующие разнообразие типов укладки мембранных белков с отщепляемыми сигнальными последовательностями, а также неотщепляемыми N-концевыми и внутренними сигнальными последовательностями. Если сборка регулируется с помощью линейной последовательности сигналов, то используются сигналы трех типов: 1) сигнал, инициирующий перенос C-концевого фланкирующего домена (а, б, в, г, ж, з); 2) сигнал, инициирующий перенос N-концевого фланкирующего домена (г, е); 3) стоп-сигналы переноса (б-з).

10.2. Общие особенности экзоцитозного пути [966, 768, 552, 358, 1153, 634]

Экзоцитозным в эукариотических клетках называется путь, с помощью которого осуществляется транспорт белков, секретируемых клеткой или включаемых в наружную мембрану. Секретируемые белки синтезируются на связанных с мембранами рибосомах на цитоплазматической поверхности шероховатого эндоплазматического ретикулума и выводятся из клетки с помощью того же механизма, который используется для включения мембранных белков в эндоплазматический ретикулум (рис. 10.3). Если водорастворимый белок не имеет вторичных сигналов сортировки, то он транспортируется к клеточной поверхности и секретируется с помощью «конститутивного» пути [1580]. Этот путь экзоцитоза изучался с привлечением разных цитохимических методов, генетических подходов и биохимических исследований бесклеточных систем. Белки, транспортируемые этим путем, перемещаются из эндоплазматического ретикулума последовательно через различные компартменты комплекса Гольджи и в конце концов попадают на поверхность клетки (рис. 10.4). Они могут становиться компонентами цитоплазматической мембраны или, при наличии вторичных сигналов сортировки, оставаться в эндоплазматическом ретикулуме (рибофорин, цитохром P450) или в комплексе Гольджи (различные гликозилтрансферазы). В комплексе Гольджи в ходе дальнейшей сортировки отделяются белки, секретируемые конститутивным путем (укороченный путь), от тех, которые направляются в лизосомы или концентрируются в секреторных гранулах, с помощью которых они затем секретируются при соответствующей стимуляции клетки (т. е. регулируемый секреторный путь). Кроме того, обнаружено, что в наружной мембране ядерной оболочки также могут синтезироваться мембранные гликопротеины, которые затем транспортируются с помощью экзоцитоза [1465].

Белки при транспортировке по экзоцитозному пути подвергаются посттрансляционным модификациям, в частности гликозилированию [358, 1245]. Хорошо изучена компартментация процессинга N-связанного олигосахарида (рис. 10.4 и 10.5), что очень помогло определению различных компонентов комплекса Гольджи (цис-, медиальных и транс-цистерн). Олигосахаридный предшественник с высоким содержанием маннозы (рис. 3.16) присоединяется по местам гликозилирования в полипептиде (по остаткам аспарагина), когда белок находится внутри эндоплазматического ретикулума, а затем с помощью нескольких расположенных в различных компартментах ферментов осуществляется процесс созревания [552, 358, 1153, 634, 1245]. Это позволяет следить за превращением белков, определяя состояние их гликозилирования. На рис. 10.5 представлен

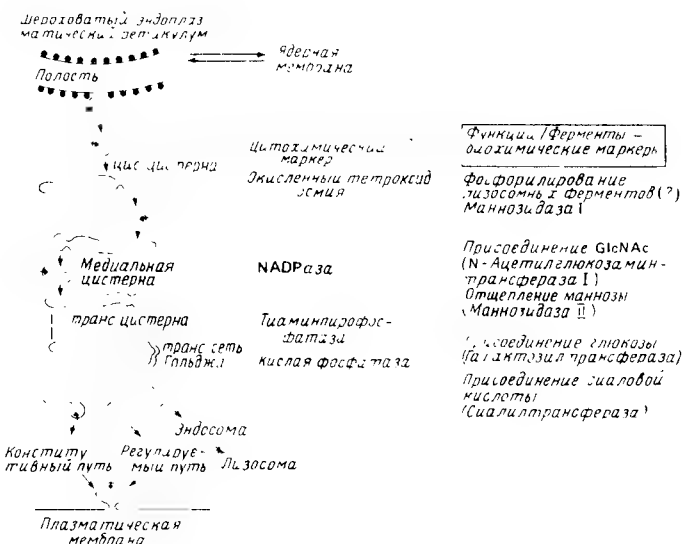


Рис. 10.4. Схема экзоцитоза мембранного белка (стрелки) от момента его попадания в эндоплазматический ретикулум до включения в плазматическую мембрану [552]. Различие между *транс*-цистернами Гольджи и *транс*-сетью Гольджи чисто гипотетическое [11]. Предполагается, что транспорт осуществляется при помощи везикул. GlcNAc — N-ацетилглюкозамин.

процессинг олигосахаридного предшественника с высоким содержанием маннозы.

В исследованиях экзоцитозного пути был достигнут значительный прогресс благодаря использованию вирусов с оболочкой, в частности вируса везикулярного стоматита (VSV). Механизм проникновения генома таких вирусов в клетку путем слияния мембраны вирусной частицы с мембраной животной клетки обсуждался в разд. 9.5.2, а процесс отпочковывания вирусных частиц от мембраны животной клетки — в разд. 4.5.3. Гликопротеин шиповидной структуры вируса везикулярного стоматита, называемый G-белком, — это трансмембранный белок, который синтезируется на рибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикулулом, после инфекции. С помощью экзоцитозного пути G-белок попадает на плазматическую мембрану, где он участвует в образовании отпочковывающегося вируса (рис. 4.9). Инфицируя клетки этим вирусом, можно проследить за процессингом кодируемого вирусным геномом G-белка, что позволит исследовать экзоцитозный путь [1250, 61, 1099, 168, 60]. Этот подход используется для идентификации везикул, участвующих во внутриклеточном транспорте [1099], для изу-

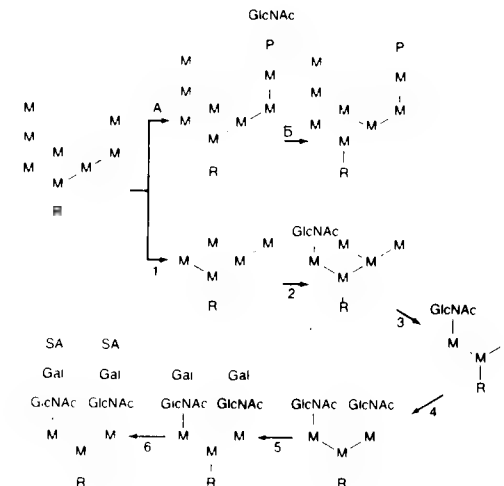


Рис. 10.5. Процессинг олигосахарного предшественника с высоким содержанием маннозы, осуществляющийся в комплексе Гольджи [358]. В эндоплазматическом ретикулуме отщепляются три остатка глюкозы и по крайней мере один остаток маннозы с образованием предшественника, изображенного вверху слева. На стадиях *A* и *Б* происходит фосфорилирование одного остатка маннозы при участии лизосомных ферментов. На стадиях 1—6 образуется разветвленный (с двумя ветвями) олигосахарид. В этом процессе участвуют следующие ферменты: маннозидаза I комплекса Гольджи (1), GlcNAc-трансфераза (2), маннозидаза II (3), GlcNAc-трансфераза II (4), галактозилтрансфераза (5) и сиалилтрансфераза (6). М — манноза, GlcNAc — N-ацетилглюкозамин, Gal — галактоза, SA — сиаловая кислота, P — фосфат, R — (GlcNAc)₂-аспарагин-(белок).

чения влияния гликозирования на доставку белков к клеточной поверхности [168], для исследования энергетики экзоцитозного транспорта и, что наиболее важно, для создания бесклеточной системы везикулярного внутриклеточного транспорта [1250, 61].

Эти исследования выявили несколько замечательных особенностей системы экзоцитозного транспорта.

1. Транспорт между различными компартментами органеллы осуществляется с помощью везикул, которые отпочковываются от «донорной» мембраны и потом сливаются с «акцепторной». Показано, что везикулы, участвующие в транспорте между компартментами комплекса Гольджи, являются «окаймленными», но соответствующий белок отличается от клатрина, окаймляющего эндоцитозные везикулы [1099]. Имеются веские данные в пользу того, что клатрин не является существенным компонентом экзоцитозного пути [344, 1254], хотя он, по-видимому, необходим для нормального роста некоторых штаммов дрожжей [832]. Степень общности ком-

поиентов эндоцитозного и экзоцитозного путей неясна, хотя некоторые везикулы, вероятно, функционируют в обоих случаях [433].

2. Для внутриклеточного транспорта необходим АТФ [1250, 61, 60], а также белковые компоненты цитозоля [1558]. Показано, что для транспорта между цистернами Гольджи, осуществляющегося при участии везикул, необходимо жирнокислотное производное ацил-СоА [520, 1250]. Какую именно функцию выполняют указанные соединения в отпочковывании и слиянии везикул, неизвестно.

3. Роль олигосахарида как сигнала сортировки новосинтезированных гликопротеинов, по-видимому, непостоянна. Известны случаи, когда процессинг N-концевого углевода не является необходимым для экспрессии белка плазматической мембраны на клеточной поверхности [285, 168]. В других системах гликозилирование существенно для доставки белка к клеточной поверхности [557], например, оно необходимо для включения опсина в мембрану наружного сегмента палочки сетчатки [440]. Во многих клетках млекопитающих сигналом сортировки для белков, направляемых в лизосомы, является маннозо-6-фосфат [778], однако для дрожжей это не характерно [1485, 711]. В тех клетках млекопитающих, где маннозо-фосфат функционирует как сигнал сортировки, обнаружены два мембранных рецептора с высоким сродством к гликопротеинам, содержащим маннозо-6-фосфат, и клонированы их гены [1385, 869, 1168]. Они играют ключевую роль в процессе переноса конкретных полипептидов в лизосомы, а один из этих рецепторов существен как для эндоцитоза, так и для экзоцитоза [1385, 139].

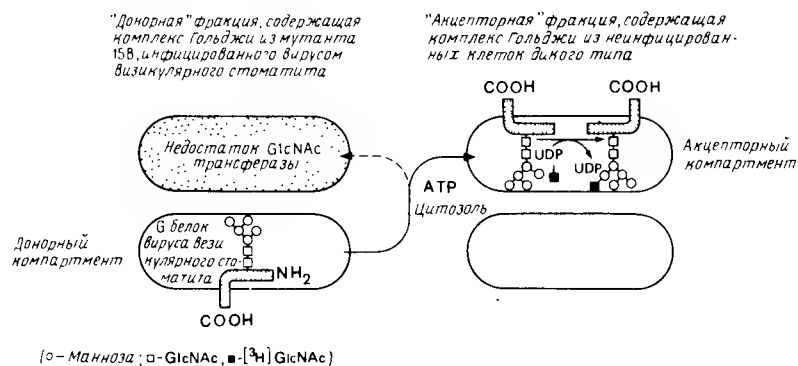


Рис. 10.6. Метод, используемый для контроля транспорта белка между компартментами комплекса Гольджи *in vitro* [61]. Для присоединения [³H]GlcNAc к олигосахариду центральной части необходимо перенести вирусный G-белок из комплекса Гольджи инфицированных клеток в комплекс Гольджи, полученный из клеток с активной N-ацетилглюкозаминтрансферазой I. GlcNAc — N-ацетилглюкозамин.

Исследование бесклеточной системы, изображенной на рис. 10.6, показало, что для изучения таких сложных систем полезно использовать специфические мутанты. Выделено множество мутантных штаммов дрожжей, дефектных по разным стадиям экзоцитозного пути [326, 421], и некоторые из них использовались при создании бесклеточной системы транспорта между органеллами [599]. Оказалось, что системы дрожжей и млекопитающих весьма сходны [359], и для исследования последних можно с успехом использовать мутантные штаммы дрожжей. Наконец, обнаружено, что многие вирусы с оболочкой способны отпочковываться не только от плазматических, но и от других мембран и, таким образом, могут быть полезны для изучения других аспектов внутриклеточной сортировки белков и мембранного транспорта [1240].

Дополнение 10.1. Изучение внутриклеточного транспорта, осуществляемого с помощью везикул *in vitro*

На рис. 10.6 схематически представлен метод изучения транспорта вирусного G-белка между соседними компартментами комплекса Гольджи *in vitro*. Важной особенностью метода является то, что он позволяет определить биохимическим путем компоненты, необходимые для этого процесса. Из двух типов клеток, обозначаемых как «донор» и «акцептор», выделяют мембранные фракции, содержащие комплекс Гольджи. При этом донорную фракцию получают из мутантных клеток, у которых отсутствует фермент UDP-N-ацетилглюкозамингликозилтрансфераза I и которые были инфицированы вирусом везикулярного стоматита. Процессинг олигосахарида, связанного с G-белком, в этих клетках блокирован. Акцепторную фракцию получают из неинфицированных клеток дикого типа. Для присоединения [³H]N-ацетилглюкозамина к новосинтезированному G-белку должен произойти перенос G-белка от донорной фракции к акцепторной, где необходимый фермент имеется. Количество включенного [³H]N-ацетилглюкозамина определяют после иммунопреципитации. Данная методика позволяет исследовать транспорт из *цис*-компартамента аппарата Гольджи в медиальный компартмент [61]. Аналогичные работы, в которых наблюдали за присоединением сиаловой кислоты, выявили наличие транспорта *in vitro* между *транс*-элементами аппарата Гольджи [1250].

10.3. Характерные особенности биосинтеза мембранных белков [1268, 1576, 1195]

Проблема сборки белков очень важна. Как мы увидим, этот процесс обычно не протекает самопроизвольно, лишь в результате взаимодействия между образующимися полипептидами и липидным бислоем. Напротив, он является энергозависимым и опосредуется белковыми структурами, которые пока не изучены в достаточной степени. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что перенос белков через мембрану (например, в полость эндоплазматического ретикулума) и сборка интегральных мембранных белков — это тесно связанные стороны одного и того же процесса. Логично ожидать, что проблемы транспортировки белков через мембраны и их укладки должны решаться одинаковым образом. Прежде чем обсуждать общие особенности сборки молекул в различных системах, полезно остановиться на методах экспериментального исследования этого процесса.

Наиболее детально изучены бесклеточные системы, в которых гораздо легче количественно исследовать процессы переноса и протеолитического процессинга белков. Во всех этих системах используются мембранные везикулы или препараты органелл, у которых поверхность, обращенная в цитоплазму, «смотрит» наружу, поскольку перенос белков осуществляется из цитоплазмы. Этому условию удовлетворяют микросомы, полученные из эндоплазматического ретикулума секретирующих клеток, митохондрий и хлоропластов. Вывернутые везикулы можно получить из клеток *E. coli*; они представляют собой удобный объект для изучения переноса белков в бесклеточной системе [1034, 204, 500].

Полипептид-предшественник, находящийся во внешней среде, при соответствующих условиях будет переноситься внутрь пузырька или по крайней мере через мембрану пузырька или органеллы. За этим процессом обычно следят, добавляя протеазы во внешнюю среду. Степень защиты от протеолиза является мерой количества полипептида, транспортированного внутрь везикулы или органеллы. Как показано схематически на рис. 10.7, за ходом протеолитического процессинга, осуществляемого сигнальной пептидазой, следят с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Белки, встроенные в мембрану, можно идентифицировать с помощью щелочной экстракции; при этом предполагается, что белки, которые связаны с поверхностью мембран, при такой обработке удаляются. Однако так бывает не всегда, поэтому результаты, полученные с помощью щелочной экстракции, необходимо интерпретировать с осторожностью.

В таких бесклеточных системах можно изучать биохимические условия переноса белков и идентифицировать необходимые раство-

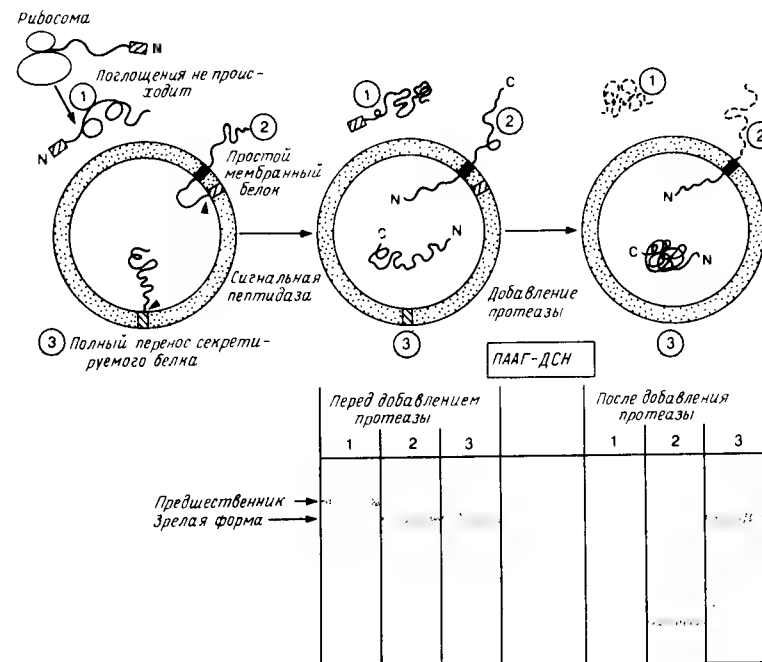


Рис. 10.7. Схема проведения опыта по изучению встраивания белка в мембрану везикулы. Метод основан на защите полипептида от протеолитического расщепления при проникновении его (частично или полностью) в везикулу. Белки (обычно радиоактивно меченные) подвергают иммунопреципитации и анализируют с помощью электрофореза в ПААГ—ДСН. Сигнальный пептид этим методом не обнаруживается.

римые компоненты. Кроме того, при этом можно варьировать природу переносимого полипептидного «субстрата». Аналогичные исследования можно проводить *in vivo* с помощью метода импульсного мечения. При этом уменьшается вероятность появления артефактов, связанных с искусственностью бесклеточных систем [1345, 1497, 275].

При изучении бесклеточных систем были получены весьма важные данные об условиях, необходимых для переноса белков.

1. *Посттрансляционный и котрансляционный перенос.* Принято считать, что во всех исследованных системах перенос в мембраны или через мембраны может осуществляться независимо от трансляции [1288]. Убедительные данные на этот счет были получены для процесса переноса белков в хлоропластах и митохондриях, а также — после длительных дискуссий — для переноса через бак-

териальную мембрану. Долгое время считалось, что перенос белков в эндоплазматический ретикулум или через мембраны эндоплазматического ретикулума всегда осуществляется параллельно трансляции, однако в конце концов было четко показано, что такая параллельность не обязательна. По крайней мере в одном случае — для препро- α -фактора — наблюдался посттрансляционный транспорт в микросомы дрожжей, не зависящий от рибосом [1555, 589]. Было также показано, что хотя у высших эукариот для переноса через эндоплазматический ретикулум элонгации белков не требуется [1136, 1029, 1028], в большинстве случаев процесс переноса все же зависит от рибосом и происходит в то время, когда новосинтезированный полипептид еще удерживается рибосомой [1136]. Важный вывод состоит в том, что энергия, необходимая для переноса, не исходит от рибосомного биосинтетического аппарата.

Заметим, что эти данные лишь констатируют то, что процессы переноса и трансляции можно разграничить экспериментально. В клетке эти процессы тесно связаны по крайней мере в случае белков, транспортируемых в эндоплазматический ретикулум клеток млекопитающих, и многих белков *E. coli* [83].

2. *Энергетические требования к переносу.* Как правило, перенос белков в мембраны или через них энергозависим. Необходимым условием переноса как для прокариотических, так и для эукариотических систем является гидролиз АТФ (или другого нуклеозидтрифосфата). Это было показано для следующих процессов: а) переноса белков в строму хлоропластов [1117, 442]; б) транспорта белков в митохондриальный матрикс [371, 1149, 207], внутреннюю [1149] и наружную мембраны [76]; в) переноса белков через эндоплазматический ретикулум дрожжей [589, 1555] и пост-трансляционного встраивания мембранного белка в эндоплазматический ретикулум млекопитающих [10288]; г) переноса белков через цитоплазматическую мембрану *E. coli* [204, 1612, 500, 1151]. Ни в митохондриях, ни в мембранах *E. coli* АТФ-зависимая активность не принадлежит АТФазе и ее роль не состоит в генерировании трансмембранного потенциала.

Еще одним независимым условием переноса белков в матрикс митохондрий [371, 1149, 207] и во внутреннюю мембрану митохондрий [1149] является наличие на последней трансмембранного потенциала. Этот потенциал, очевидно, необходим на ранней стадии процесса, при связывании белка с митохондрией. Для транспорта по крайней мере некоторых белков в хлоропласт это условие не является обязательным [117]. Однако для оптимизации переноса белков через плазматическую мембрану *E. coli* также нужна трансмембранная протондвижущая сила [1612, 500, 204, 308]. Заметим, что направление переноса белков относительно полярности $\Delta\psi$ в *E. coli* и митохондриях противоположно, а имеет ли мембрана эндоплаз-

матического ретикулума трансмембранный потенциал — неизвестно.

3. *Способность предшественника к переносу* [1252]. Имеются веские доводы в пользу того, что ключевую роль в успешном переносе белка играет его четвертичная структура. Скорее всего это связано с тем, что сигнальная последовательность(ти), узнаваемая аппаратом переноса, должна быть доступна для него. Следовательно, для осуществления переноса белок должен быть неплотно свернут или частично развернут. Кроме того, если белки переносятся через мембрану в вытянутой конформации, то аппарат переноса должен быть способен к их развертыванию во время самого процесса переноса. Если бы белки-предшественники обладали стабильной четвертичной структурой, то они с трудом развертывались бы и, следовательно, не были способны к переносу.

Наиболее четкие данные о том, что белки транспортируются в вытянутой конформации, получены в работе [1298], авторам которой удалось идентифицировать интермедиаты при переносе двух разных белков в матрикс митохондрий. Было показано, что N-концы этих интермеднатов погружены в матрикс, а основная их часть находится вне митохондрии. Таким образом, интермедиаты должны протянуться через внутреннюю и наружную мембраны; при этом полагают, что место их входа совпадает с местом слияния двух мембран [1307].

Дополнение 10.2. Белки могут транспортироваться через мембрану только в развернутом виде

Шац и др. [370, 1514] изучали перенос через мембрану тетрагидрофолатредуктазы, к которой была искусственно присоединена митохондриальная сигнальная последовательность; без этой последовательности белок не мог проникать в митохондрию. После внедрения в матрикс митохондрии сигнальная последовательность удалялась сигнальной пептидазой. Чтобы выяснить, может ли проходить через мембраны митохондрий белок, находящийся в свернутой конформации, измеряли эффективность транспорта в присутствии метотрексата — ингибитора, который с высокой избирательностью связывается с нативной формой тетрагидрофолатредуктазы. Обнаружили, что связывание метотрексата приводит к прекращению транспорта, возможно вследствие того, что ингибитор стабилизирует фермент в компактной форме. Было показано также, что для проникновения в митохондриальный матрикс предшественника β -субъединицы F_1F_0 -АТФазы необходимо его развертывание [206].

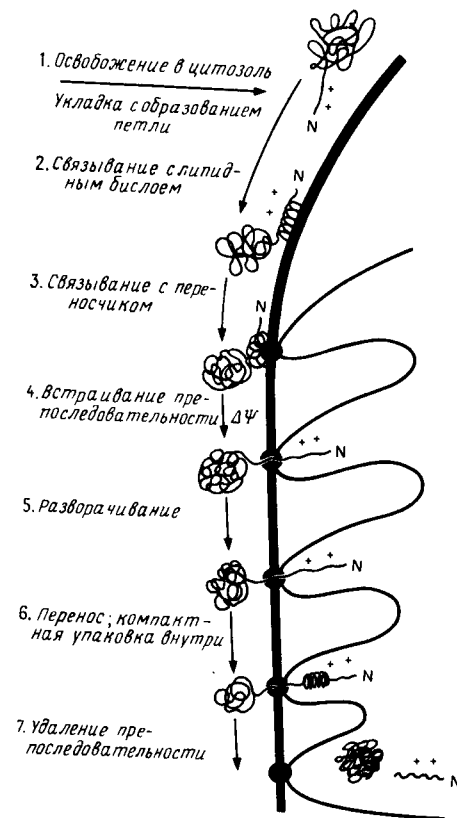


Рис. 10.8. Рабочая модель посттрансляционного транспорта белков в митохондриальный матрикс [1514]. Сигнал или препоследовательность обозначена двумя знаками +. Некоторые этапы могут осуществляться одновременно (3 и 4 или 5, 6 и 7). Этап 5 может отсутствовать, если предшественник свернут не полностью.

Изучался транспорт в митохондрии укороченных предшественников тетрагидрофолатредуктазы [1514]. Они содержали митохондриальную сигнальную последовательность, но трансляция была прервана до завершения синтеза полипептида. Такие укороченные предшественники не связывали метотрексат, а возможно, и не могли свертываться в конформацию, подобную нативной. Однако они проникали в митохондрии. Особый интерес представлял тот факт, что транспорт укороченных предшественников в отличие от транспорта полноразмерного белка мог осуществляться в отсутствие АТФ. Это еще раз подтверждало тот факт, что АТФ необходим для разворачивания полипептида (происходящего до переноса или па-

раллельно ему). На рис. 10.8 схематически представлена модель процесса переноса белков в митохондрии с указанием стадий, протекающих лишь при наличии трансмембранного потенциала и АТФ.

К аналогичным выводам о роли АТФ привело исследование транспорта порина в наружную митохондриальную мембрану [1612, 1147]. Этот белок не имеет отщепляемой сигнальной последовательности, и вся необходимая для транспорта информация закодирована внутри молекулы зрелого белка. Белок был выделен в водорастворимой форме, вероятно частично денатурированной, но и в таком виде был способен к переносу. Перенос водорастворимого предшественника не требовал АТФ. Этим он отличался от белка, который проникал в митохондрию сразу по завершении синтеза в системе *in vitro*. По-видимому, и в этом случае АТФ требуется для активного процесса разворачивания белковой молекулы.

Перенос белка, связывающего мальтозу, через плазматическую мембрану *E. coli* в периплазматическое пространство тоже зависит от конформации предшественника [1191]. Так, мутантный белок с измененной сигнальной последовательностью, не способный к транспорту, менее чувствителен и к протеолитическому расщеплению, т. е. более плотно свернут. Белок же, в большей степени подверженный протеолизу, способен и к переносу. Это согласуется с данными по митохондриям. По-видимому, при наличии сигнального пептида на N-конце замедляется укладка полипептида. Интересен тот факт, что мутация в сигнальном пептиде, которая приводит к блокированию переноса, может супрессироваться второй мутацией в зрелом белке [254]. Предшественник, несущий обе мутации, значительно менее стабилен в цитоплазме, чем молекулы с одной мутацией в сигнальной последовательности, возможно, из-за того, что он находится в более развернутой конформации.

Обсуждался и вопрос о том, что, по-видимому, для предотвращения свертывания предшественника в нативную конформацию необходим какой-то растворимый белковый кофактор. Так, был выделен в водорастворимой форме, сходной с порином митохондрий, предшественник белка наружной мембраны *E. coli* OmpA [259], который был не способен к эффективному переносу через плазматическую мембрану, если в цитозоле отсутствовал белок, называемый «триггер-фактором». Давно известно, что для переноса белков через мембраны эндоплазматического ретикулума млекопитающих или в эндоплазматический ретикулум необходим растворимый кофактор, а именно — *сигнал-распознающая частица* (СРЧ) [1312] (разд. 10.3.4). Возможно, роль этого фактора состоит в предотвращении сворачивания предшественника полипептида [1547].

10.3.1. НУЖНЫ ЛИ ДЛЯ ПЕРЕНОСА БЕЛКОВ КАНАЛЫ?

Экспериментальные данные, которые однозначно свидетельствовали бы о существовании каналов, участвующих в сборке мембранных белков или в переносе белков через мембрану, отсутствуют. Известно, впрочем, что как на поверхности митохондрий [1147], так и в эндоплазматическом ретикулуме [1578] имеются мембранные рецепторы, которые специфически узнают переносимые белки, и, возможно, именно они являются частью сложного аппарата, куда входит и канал, по которому перемещается белок [1350].

Для того, чтобы перенос белков происходил со скоростью, близкой к скорости синтеза полипептида (1—10 остатков в 1 с), энергетический барьер не должен превышать примерно 18 ккал/моль [388]. По данным работы [388], две соседние спирали могут спонтанно встраиваться в бислой с образованием спиральной шпильки, и соответствующий выигрыш свободной энергии ~ 60 ккал/моль может стать движущей силой для частичного втягивания полярных и даже заряженных групп в липидный бислой. Однако, как мы говорили в гл. 3, для переноса ионизированных и полярных групп из водного окружения в липидный бислой необходимо большее количество свободной энергии [389, 646], и вряд ли модель спонтанного встраивания будет применима всегда, поскольку при сборке многих мембранных белков необходимо транспортировать через мембрану длинные, часто сильно заряженные полипептидные цепи.

Тем не менее было показано, что некоторые небольшие мембранные белки включаются в липидные бислои спонтанно. К ним относятся цитохром *b₅* с единственным гидрофобным якорем на С-конце (см. разд. 4.2.2) и пробелок оболочки бактериофага M13, предположительно содержащий две трансмембранные спирали, которые, возможно, и встраиваются в бислой с образованием спиральной шпильки или петли. Пробелок оболочки содержит сигнальную последовательность из 23 остатков, обычно отщепляемую при сборке в цитоплазматической мембране *E. coli*. Зрелый белок (50 аминокислотных остатков) имеет кислый N-конец, обращенный в периплазматическое пространство, трансмембранный сегмент и основной С-конец, обращенный в цитоплазму (рис. 10.9). Он спонтанно встраивается в фосфолипидные липосомы [501], причем скорость его сборки *in vivo* сильно замедляется, если в трансмембранном участке или на С-конце зрелого белка имеются мутации [798, 797], что согласуется с моделью, в рамках которой два гидрофобных сегмента могут спонтанно встраиваться в липидный бислой в виде шпильки или петли [388, 796]. На рис. 10.9 представлена схема встраивания этого белка в мембрану. Интересно, что сборка пробелка оболочки вируса M13 может осуществляться и с помощью микросом млекопитающих, причем этот процесс требует АТР, воз-

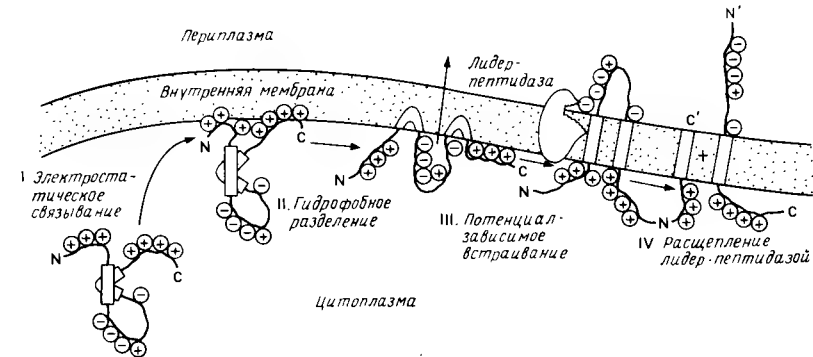


Рис. 10.9. Рабочая модель спонтанного встраивания пробелка оболочки фага M13 во внутреннюю мембрану *E. coli* [798].

можно, для поддержания необходимой для транспорта конформации [1577]. Следует отметить, что этот белок не типичен для белков, сборка которых осуществляется на плазматической мембране *E. coli*, поскольку он имеет отщепляемую сигнальную последовательность, и его сборка происходит независимо от функций генов *secA*, *secY* (*prfA*), необходимых для переноса белков внутрь плазматической мембраны или через нее [1600, 84].

Результаты исследования пробелка оболочки бактериофага M13 убедительно проиллюстрировали справедливость механизма самопроизвольного встраивания белков в мембрану без участия белков-посредников. Предполагается, что водорастворимый предшественник приобретает конформацию, обеспечивающую встраивание его в мембрану, при взаимодействии с бислоем. Эта обобщенная модель была предложена как часть «мембранной триггерной гипотезы» [1575]. Сходный механизм был предложен для сборки по крайней мере каких-то участков более сложных мембранных белков, например переносчика глюкозы [1028]. Заметим, что механизмы самопроизвольного встраивания путем образования петли или спиральной шпильки могут рассматриваться только в тех случаях, когда нет тесного сопряжения между мембранным переносом и трансляцией.

Еще один пример, иллюстрирующий важную роль самопроизвольного встраивания в липидный бислой при переносе, — это апоцитохром *c*, предшественник митохондриального цитохрома *c* [90, 1067]. Он не отличается по длине от зрелого цитохрома *c*, но лишен ковалентно связанного гема *c*, который присоединяется к молекуле только после переноса белка через наружную митохондриальную мембрану. Зрелый белок содержится в межмембранном пространстве митохондрий (рис. 10.1). Показано, что апоцитохром *c*, связываясь с анионными липидами в фосфолипидных везикулах, может

проникать в липидный бислой и пересекать его [90]. Механизм такой замечательной активности до конца неизвестен; возможно, при этом происходит существенная перегруппировка липидов. Удивительно, что в этом полипептиде нет протяженных гидрофобных участков и 40% аминокислотных остатков заряжены!

Применимы ли данные, полученные на искусственных фосфолипидных везикулах, к системам *in vivo*, неясно, но, согласно одной из моделей, апоцитохром с должен проникнуть в наружную мембрану достаточно глубоко для того, чтобы он мог связаться со специфическим белковым рецептором на внутренней поверхности мембраны [1067]. Впрочем, при этом не исключается наличие канала. *In vivo* ковалентное присоединение гема удерживает зрелый белок в межмембранном пространстве и, возможно, приводит к конформационным изменениям, необходимым для дальнейшего переноса [1067].

К самопроизвольному встраиванию в липидные бислои и биомембраны способны и многие другие водорастворимые белки, хотя механизм такого встраивания остается неизвестным. Основными представителями являются токсины и белки, образующие поры (разд. 8.6.1). Все построенные модели обычно предполагают, что в белке происходят конформационные изменения, в результате которых гидрофобные остатки, упрятанные внутри водорастворимой структуры, экспонируются в липидный бислой при включении в него белка. Примерами такого рода служат α -токсин из *Staphylococcus aureus* [1457], компонент комплемента C9 [1380] и колицины А [75]. Во многих случаях (экзотоксин А из *Pseudomonas* [413] и дифтерийный токсин [343]) для инициации конформационного перехода необходимо понизить pH. Вряд ли эти токсины и белки, образующие поры, могут служить модельными системами, пригодными для изучения сборки многих мембранных белков. Однако они четко показывают, что водорастворимые предшественники действительно могут самопроизвольно укладываться внутри бислоя, образуя сложные трансмембранные биохимически активные зрелые формы.

Таким образом, если речь идет о переносе линейно вытянутого полипептида, то при энергетических расчетах необходимо основываться на наличии поры, заполненной водой, или канала, способного обеспечить гидрофильное окружение для заряженных или полярных групп [1350]. Эта модель приемлема для большинства белков, хотя имеются многочисленные примеры (пробелок оболочки фага M13), когда происходит самопроизвольное включение отдельных спиралей или доменов в липидный бислой. Если специфические каналы для переноса белков действительно существуют, они должны быть очень хитро устроены, поскольку через них проходят практически любые полипептиды и задерживаются ионы и небольшие ме-

таболиты. Исследование таких пор методом пэтч-клампа не проводилось.

10.3.2. ПОЛИПЕПТИДНЫЕ СИГНАЛЫ, ОТВЕЧАЮЩИЕ ЗА СОРТИРОВКУ БЕЛКОВ И ВСТРАИВАНИЕ ИХ В МЕМБРАНУ [1528, 1289, 237, 1352]

Об аппарате и механизме переноса мы не знаем почти ничего; немного больше известно о сигнальных последовательностях, присутствующих в полипептидах и направляющих каждый белок в нужное место. Успехов в этой области удалось достичь благодаря использованию техники рекомбинантных ДНК. С ее помощью были сконструированы гибридные полипептиды, в которые была включена тестируемая аминокислотная последовательность, принадлежащая другому белку. Таким образом можно было изучать влияние предполагаемой сигнальной последовательности на локализацию «белка-пассажира». Преимущества такого подхода удается использовать только в том случае, если вся информация, определяющая локализацию конечного продукта, заключена в первичной последовательности сигнала и если «белок-пассажир» является нейтральным участником процесса и, что существенно, подчиняется сигналу. Это условие выполняется во многих случаях [1291], но известны и такие примеры, когда эффективность переноса [1497, 1554, 798] или даже конечная локализация [689] зависят от «белка-пассажира». Если «белок-пассажир» находится в конформации, не способной к переносу, то может происходить блокирование переноса химерного белка. Кроме того, функция некоторых сигнальных последовательностей зависит от их локализации в полипептиде или от взаимодействий с другими участками полипептидной цепи [234, 51, 1345, 365]. Несмотря на все эти трудности, удалось получить много ценных данных о разнообразии сигнальных последовательностей (табл. 10.1).

Сигнальная последовательность, определяющая встраивание в эндоплазматический ретикулум [1528]

У большинства белков, встроенных в мембрану эндоплазматического ретикула или пересекающих ее, на N-конце имеется «короткоживущий» сигнальный пептид (от 15 до 30 аминокислотных остатков). Эта сигнальная последовательность непосредственно взаимодействует по крайней мере с двумя рецепторами, один из которых растворим (сигнал-распознающая частица), а другой находится в мембране [1312, 1547, 1578] (разд. 10.3.4). Можно было бы ожидать, что аминокислотная последовательность этого сигнального

пептида будет очень консервативной и примерно одинаковой у всех переносимых белков, но ожидания эти не оправдались. Эти сигнальные участки не отличаются постоянством ни в отношении длины, ни в отношении аминокислотной последовательности, а многочисленные опыты по мутагенезу показали, что они могут претерпевать значительные структурные изменения. Данные о том, что сигнальные пептиды содержат всю информацию, необходимую для транспорта белков через мембраны эндоплазматического ретикулаума или внутрь их, были получены в опытах с химерными полипептидами. Присоединение N-концевой сигнальной последовательности к обычным цитоплазматическим белкам, например к глобину, приводило к тому, что они транспортировались в полость эндоплазматического ретикулаума [1345].

С точки зрения «сравнительной анатомии» N-концевых сигнальных последовательностей можно выделить три разных в структурном отношении участка: 1) положительно заряженный N-концевой участок (n-участок); 2) центральное гидрофобное ядро из 7—15 остатков (h-участок); 3) C-концевой участок (с-участок), который является полярным и содержит сайт, узнаваемый сигнальной пептидазой, которая находится на стороне эндоплазматического ретикулаума, обращенной в полость [1528]. Показано, что многочисленные случайные последовательности способны выполнять функцию нормального сигнального пептида у инвертазы дрожжей и детерминировать ее секрецию [720]. Анализ этих случайных последовательностей показал, что решающим фактором является их гидрофобность. На рис. 10.10 приведены данные о гидрофобности и длине гидрофобных участков известных сигнальных пептидов эукариот и большинства гидрофобных участков, обнаруженных в цитозольных белках эукариот (многие из которых расположены на N-конце), а также известных трансмембранных якорных участков мембранных белков. Из этих данных видно, что h-область обладает свойствами, промежуточными между свойствами соответствующих участков цитозольных белков, с одной стороны, и типичных трансмембранных сегментов — с другой.

Очевидно, структурная специфичность для процесса узнавания не играет существенной роли. Однако необходимо помнить, что изменение свободной энергии менее чем на 5 ккал/моль (примерно такая энергия одной водородной связи) соответствует изменению сродства в 1000 раз. Такое различие в сродстве вполне может быть обусловлено тонкими различиями между функциональными и нефункциональными сигнальными последовательностями. Моделью рецептора сигнального пептида может служить растворимый фрагмент антигена гистосовместимости класса I, а именно HLA-A2, трехмерная структура которого известна [104]. Этот белок связывается с пептидами — компонентами чужеродных антигенов, что является

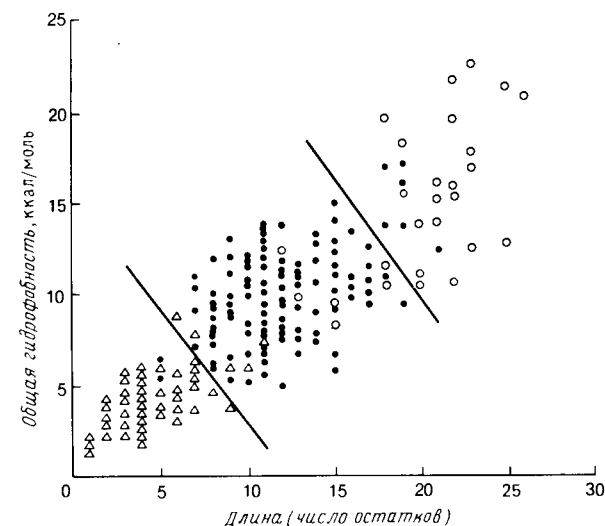


Рис. 10.10. Зависимость суммарной гидрофобности от длины полипептида [1528]. Темные кружки — сигнальные пептиды эукариот; светлые кружки — C-концевые трансмембранные закорячивающие сегменты; треугольники — наиболее гидрофобные участки ряда цитозольных белков. Данные, ограниченные двумя прямыми, охватывают 92% сигнальных пептидов, 20% якорных участков и 4% последовательностей цитозольных белков.

частью иммунного ответа (разд. 9.3.4). Область связывания пептида представляет собой большой желобок, открытый с одного конца и способный вмещать пептид из 20 аминокислотных остатков, если тот имеет форму α -спирали. О пептидах, которые могут связываться с HLA-A2, известно немного; показано, в частности, что близкородственный антиген гистосовместимости класса II проявляет высокое сродство к самым разным аминокислотным последовательностям. По-видимому, наиболее важными общими характеристиками пептидов, которые могут связываться с высоким сродством, являются вторичная структура и амфифильность. Стабилизации комплекса могут способствовать многочисленные взаимодействия в области связывания.

Известно, что относительно небольшие различия между сигнальными последовательностями порождают огромные различия в поведении белка. Например, если сигнальная последовательность не распознается сигнальной пептидазой, то белок чаще остается связанным с мембраной, чем секретируется (рис. 10.3, Б) [861], хотя есть и исключения из этого правила [1345, 608]. Обычно сигнальные последовательности, которые служат также N-концевыми якорями,

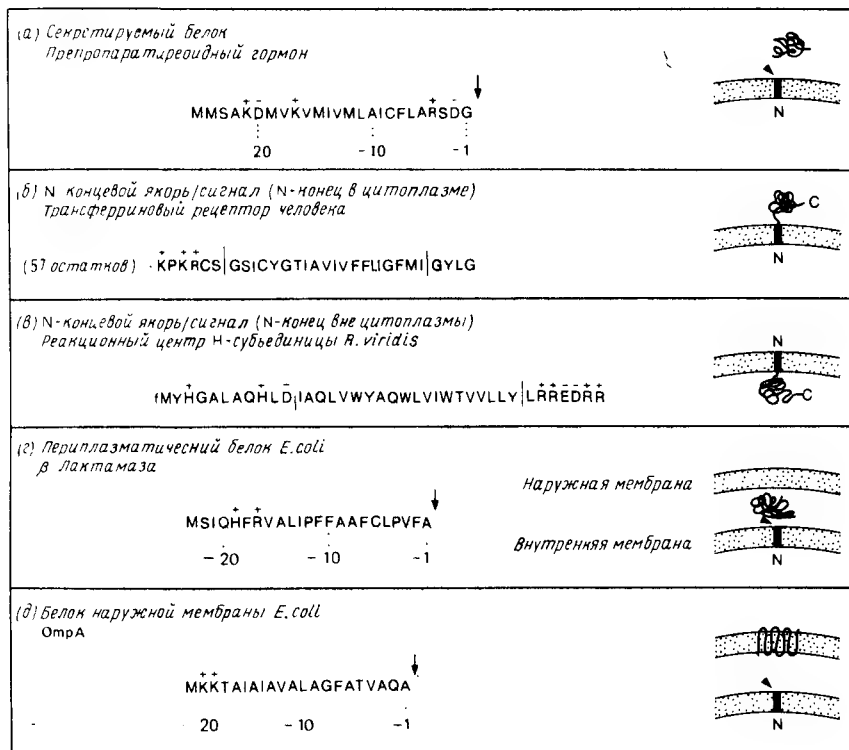


Рис. 10.11. Некоторые N-концевые сигнальные последовательности, ответственные за транспорт белков в эндоплазматический ретикулум эукариот или через него (а и б) либо в цитоплазматическую мембрану грамотрицательной бактерии. Сигнальные последовательности в случаях б и в являются также стоп-сигналами переноса и мембранными якорями, но они имеют противоположную ориентацию в бислое.

имеют более протяженный гидрофобный h-участок длиной около 20 аминокислотных остатков; этот участок необходим для остановки переноса и/или образования стабильного якоря в мембранном бислое [1528]. Примером такой сигнальной/якорной последовательности служит трансферриновый рецептор (рис. 10.11). Заметим, что в этом случае сигнальная последовательность расположена не на N-конце, а на расстоянии более чем 50 аминокислотных остатков от него.

Известны также случаи, когда сигнальная последовательность закрепляет зрелый белок в противоположной ориентации, т. е. N-конец оказывается обращенным наружу [1528]. В качестве примера можно привести цитохром P450 микросом крысы ([108] и рис. 3.11),

инвариантную цепь антигенов гистосовместимости класса II мыши [862], несколько вирусных белков [1589] и N-субъединицу реакционного центра *R. viridis* (рис. 3.6). Каким-то образом эти сигнальные/якорные последовательности «проталкивают» свой N-конец через мембрану и останавливают трансляцию, так что основная часть белка остается в цитоплазме (рис. 10.3, д). Отмечалось [1528], что в некоторых из этих случаев сигнальные последовательности «старт/стоп» несут по крайней мере один отрицательный заряд в п-области (см., например, рис. 10.11). Однако для встраивания указанных мембранных белков, как и белков обычного типа, используется одинаковый аппарат переноса — СРЧ [1274, 862]. Возможно, наличие отрицательного заряда облегчает самопроизвольный или опосредованный белком перенос N-концевых остатков через мембрану.

Как мы уже отмечали, сигнальные последовательности не обязательно находятся на N-конце белковой молекулы и могут направлять перенос обоих фланкирующих доменов, по крайней мере в случае искусственных гибридных белков [1345, 1137]. Уникальным примером такого рода является овальбумин, секреция которого детерминирована неотщепляемой внутренней сигнальной последовательностью [423]. У многих мембранных белков эндоплазматического ретикулума неотщепляемые сигнальные последовательности тоже расположены в средней части полипептидной цепи и играют роль трансмембранных якорей (рис. 10.3, з). В качестве примера можно привести асиалогликопротеиновый рецептор [641, 1372]. Внутренняя сигнальная последовательность этого белка использует тот же аппарат переноса, что и N-концевая последовательность; и действительно, в искусственных гибридах эта внутренняя сигнальная последовательность функционирует как обычная N-концевая последовательность [1372]. Примерами белков с внутренней неотщепляемой сигнальной последовательностью, которые имеют многочисленные трансмембранные сегменты и N-конец которых находится на внутренней стороне мембраны, служат переносчик глюкозы и анионный переносчик белок полосы 3 [1268, 1576, 1028] (рис. 10.3, ж). Напротив, у опсина, тоже содержащего внутренний неотщепляемый сигнальный пептид, N-конец находится с наружной стороны мембраны [51] (рис. 10.3, е). Этот внутренний сигнал (предположительно первый трансмембранный сегмент) протягивает гидрофильный аминокислотный домен (36 аминокислотных остатков) через мембрану, и, таким образом, его ориентация противоположна той, которая наблюдается в более общем случае при переносе полипептида, начиная с С-конца. Причина такого поведения опсина неизвестна; возможно, важную роль играет природа N-концевого пептида [51].

Итак, от небольших изменений в сигнальных последовательностях зависит, будет ли «белок-пассажир» секретироваться в полость

эндоплазматического ретикулума или он останется прикрепленным к мембране, и какой будет ориентация N-конца мембранного белка. Было показано, что существуют все возможные топологические варианты (рис. 10.3). Важным моментом является то, что во всех случаях сборка осуществляется при помощи одного и того же аппарата.

Стоп-сигналы переноса

Как отмечалось в предыдущем разделе, для неотщепляемых сигнальных последовательностей, которые играют роль N-концевых якорей в образовавшемся мембранном белке, характерно наличие относительно длинных гидрофобных участков [1528]. Отсюда следует, что перенос может останавливаться просто при наличии протяженного гидрофобного участка, который способен образовать трансмембранную α -спираль. В пользу такого предположения свидетельствуют некоторые экспериментальные данные. Например, с помощью рекомбинантной ДНК в среднюю часть белка *E. coli*, в норме секретирующегося через плазматическую мембрану, встраивали гидрофобные сегменты [295]. Если их длина была не менее 16 аминокислотных остатков, то транспорт белка блокировался и он оставался присоединенным к плазматической мембране. Можно возразить, что в данном случае речь идет о бактериальной системе, но, как мы увидим ниже (см. раздел, посвященный сигнальным последовательностям бактерий), механизмы переноса в про- и эукариотических системах, по-видимому, сходны. Далее были сконструированы варианты G-белка вируса везикулярного стоматита с измененными мембранными доменами. Длина гидрофобного сегмента могла составлять не 20, а 8 остатков, при этом полипептид оставался трансмембранным, хотя транспорт в плазматическую мембрану блокировался [2]. Таким образом, природа стоп-сигнала переноса точно не известна. Необходимо выяснить два вопроса: 1) участвуют ли в остановке процесса специфические белки аппарата переноса; 2) определяется ли остановка переноса гидрофобностью стоп-сигнала или какими-то более тонкими факторами? Было показано, что участки стоп-сигнальной последовательности, ответственные за блокирование переноса через эндоплазматический ретикулум, могут никак не влиять на транспорт через мембрану хлоропласта [878]. Это означает, что упомянутые два процесса могут существенно различаться.

Определение старт- и стоп-сигналов подразумевает линейную схему переноса, начинающегося с N-конца; об этом свидетельствует поведение простых систем. Однако оказалось, что последовательности, которые блокируют перенос в одном случае, могут инициировать его в другом [51, 1000]. Следовательно, важна не только

природа самих стоп- или старт-последовательностей, но и их окружение в полипептиде.

Вторичные сигналы экзоцитозной системы

Функция сигнального пептида состоит в направлении белков в эндоплазматический ретикулум и в инициации переноса. Из рис. 10.1 видно, что как мембранные белки, так и растворимые белки, которые попадают в полость эндоплазматического ретикулума, имеют несколько мест назначения. Информация, определяющая их локализацию, каким-то образом кодируется в зрелом полипептиде. В отсутствие вторичного сигнала водорастворимые белки секретируются с помощью «конститутивной» секретирующей системы [1249]. Достигнуты определенные успехи в идентификации сигналов, ответственных за направление растворимых белков в лизосомы или секреторные гранулы либо за удержание их в эндоплазматическом ретикулуме или пузырьках Гольджи (табл. 10.1). Возможно, участки этих полипептидов взаимодействуют с мембранными рецепторами, вызывая замедление их экспорта [1249].

О сигналах, ответственных за локализацию интегральных мембранных белков в экзоцитозной системе, известно немного. По-видимому, за фиксацию белка E19 аденовируса в мембране эндоплазматического ретикулума отвечает короткая последовательность на C-конце молекулы [1115]. Этот белок имеет единственный трансмембранный сегмент и цитоплазматический «хвост» из 15 остатков на C-конце. Уменьшение длины «хвоста» только на восемь аминокислотных остатков приводит к транспорту белка из эндоплазматического ретикулума. Возможно, сигнальный участок взаимодействует прямым или косвенным образом с некой цитоплазматической структурой, что обеспечивает закрепление белка E19 в эндоплазматическом ретикулуме. Исследования гликопротеина E1 коронавируса показали, что сигнальная последовательность, ответственная за его нахождение в аппарате Гольджи, локализована в одной из трех предполагаемых трансмембранных спиралей [899].

Сходная проблема сортировки возникает при выявлении вторичных сигналов, ответственных за направление мембранных белков в нужный домен плазматической мембраны в поляризованных эпителиальных клетках [937]. В этой работе использовались в основном вирусы с оболочкой, которые отпочковываются либо от апикальной, либо от базолатеральной поверхности эпителиальных клеток в культуре. Так, G-белок вируса везикулярного стоматита локализован исключительно в базолатеральной области мембраны, от которой вирус и отпочковывается, а гликопротеин гемагглютинаина (HA) транспортируется к апикальной области. Химерный гибрид,

Таблица 10.1. Сигналы для сортировки белков в эукариотических клетках

А. Первичные сигналы (эукариотические клетки)		
Органелла или мембрана	Сигнал	Ссылки
1. Эндоплазматический ретикулум	а. Обычно находится на самом N-конце и удаляется сигнальной пептидазой б. Какая-то определенная последовательность отсутствует, необходимо лишь, чтобы она носила гидрофобный характер в. Имеет три участка: <i>п-участок</i> — короткий, положительно заряженный, находится на N-конце; <i>н-участок</i> — 7-15 остатков, гидрофобное ядро; <i>с-участок</i> — содержит сайт расщепления сигнальной пептидазой, находится на C-конце г. Сигнальный пептид может также играть роль N-концевого якоря в зрелом белке с цитоплазматическим или внеплазматическим N-концом	[1528, 720]
2. Митохондрии	а. Обычно находится на самом N-конце и, как правило, удаляется протеолизом, если только местом его нахождения не является наружная мембрана б. Какая-то определенная последовательность отсутствует; отличительная особенность — положительно заряженная, амфифильная спираль. Может состоять всего из девяти остатков	[1289, 237]
3. Хлоропласты	Сходен с сигналом митохондрий	[237, 1356]
4. Ядро	Короткая последовательность ProLysLysLysArgLysValGlu, идентифицирована в большом Т-антигене вируса SV40, ответственна за локализацию белков в ядре	[1225, 523]
5. Микротельца (пероксисомы, глиоксисомы, гликосомы)	Отщепляемая сигнальная последовательность отсутствует. Природа сигнала неизвестна	[124]

Б. Вторичные сигналы экзоцитозного пути

Место нахождения	Сигнал	Ссылки
1. Лизосомы	Маннозо-6-фосфат в большинстве животных клеток, но не в дрожжах. Детерми-	[1385, 869, 1168]

Продолжение табл. 10.1

2. Эндоплазматический ретикулум	нанты аминокислотной последовательности неизвестны Короткая последовательность(ти) на C-конце отвечает за удерживание некоторых мембранных компонентов и компонентов просвета эндоплазматического ретикулума	[1038, 1115]
3. Аппарат Гольджи	Сигнальная последовательность находится в одном из трансмембранных сегментов гликопротеина Е1 коронавируса	[899]
4. Апоикальная или базолатеральная область плазматической мембраны	В некоторых случаях сигнал, определяющий конечную локализацию, содержит внецитоплазматический домен, но какую-то роль может также играть цитоплазматический домен	[937, 958, 1186]
5. Секреторные гранулы	Сигнал для трипсиногена не требует наличия сигнального пептида (первичный сигнал) или первых 12 аминокислотных остатков на N-конце нативного белка	[1249]
6. Конститутивная секреция	Укороченный путь в отсутствие вторичных сигналов	[165, 738]

состоящий из внецитоплазматического домена НА, а также мембранного сегмента и цитоплазматического «хвоста» G-белка, локализуется исключительно в апоикальной области мембраны. Эти и другие эксперименты свидетельствуют о том, что решающее значение для локализации имеет внецитоплазматический домен [958, 959]. Однако существуют данные о том, что цитоплазматический домен тоже может содержать важные сортировочные детерминанты [1186, 958]. По-видимому, сортировка белков плазматической мембраны в поляризованных эпителиальных клетках происходит в аппарате Гольджи. Однако в гепатоцитах крысы наблюдается иная картина: все белки плазматической мембраны, очевидно, направляются сначала в базолатеральную область [72].

Существенно, что вторичные сортирующие детерминанты содержатся в средней части зрелого полипептида и не являются родственными и даже не соседствуют с первичным сигнальным пептидом, ответственным за начальную локализацию в эндоплазматическом ретикулуме. Этим они отличаются от большинства вторичных сортирующих сигналов митохондрий и хлоропластов [237], а также, вероятно, бактерий.

Сигналы переноса и сортировки у бактерий [1192, 1352, 83]

Большинство работ по сборке и переносу мембранных белков были выполнены на *E. coli*. Белок, синтезируемый в цитоплазме, может направляться к цитоплазматической мембране, в периплазматическое пространство или в наружную мембрану (см. рис. 10.1). Перенос белков через внутреннюю мембрану в периплазматическое пространство или наружную мембрану часто называют экспортом. Кроме того, некоторые белки транспортируются через обе мембраны и секретируются во внешнюю среду или становятся компонентами пилей [1352]. В основном исследовался экспорт из бактериальных клеток [1192], который имеет много общего с импортом в эндоплазматический ретикулум.

Как правило, белки, направляемые в периплазматическое пространство или в наружную мембрану, имеют временные N-концевые сигнальные пептиды, весьма сходные с пептидами секретируемых белков, которые импортируются в эндоплазматический ретикулум эукариотических клеток. И в самом деле, сигнальные пептиды про- и эукариот до определенной степени взаимозаменяемы и узнаются в гетерологических системах [493]. Например, сигнальный пептид липопroteина наружной мембраны *E. coli* ускоряет перенос белков через микросомы животных клеток [493]. Сигнальные пептиды эукариот и известные сигнальные пептиды прокариот неомологичны [1352]. За очень редким исключением, белки плазматической мембраны не содержат отщепляемого сигнального пептида [1352]. К таким исключениям относятся белок оболочки фага M13 [798], не происходящий из *E. coli*, и пенициллинсвязывающие белки, которые локализируются не только в цитоплазматической мембране [67]. Генетические данные подтверждают, что в основе переноса экспортируемых белков и сборки белков плазматической мембраны лежат одинаковые биохимические механизмы [1600] и осуществляются эти процессы в соответствии со сходными механистическими принципами [1601].

Напротив, механизм секреции белков через цитоплазматическую и наружную мембраны может быть совершенно иным. Например, у гемолитина сигнальная последовательность, определяющая секрецию, находится на C-концевом участке длиной 27 аминокислот, а не на N-конце [901]. Замечательно, что секреция токсина, продуцируемого грамотрицательной бактерией *Vibrio cholerae*, через наружную мембрану происходит только после свертывания полипептида с образованием третичной и четвертичной структуры в периплазматическом пространстве [635].

По данным генетического анализа, существует не менее четырех генов, продукты которых необходимы для переноса большинства белков оболочки через цитоплазматическую мембрану: *secA*, *secB*,

secY (или *prlA*) и *secD* [83, 495]. Продукты генов *secA* и *secY* участвуют в сборке по крайней мере некоторых белков цитоплазматической мембраны, таких, как лидерная пептидаза (но не белок оболочки фага M13) [1600]. Функции продуктов этих генов неизвестны; возможно, они непосредственно участвуют в переносе белков. Биохимические исследования, проводимые в этой области [1034], гораздо более трудоемки, чем генетические. Работы с использованием мутантов, дефектных по секреции белков, не выявили никаких механистических деталей; тем не менее полученные данные подтвердили наличие тесной связи между процессами секреции и трансляции белков *in vivo* [1398, 864]. О такой связи свидетельствуют и биохимические данные, хотя в некоторых случаях (в частности, в случае белка оболочки фага M13) *in vivo* белок включается в мембрану по завершении трансляции [1192]. Однако продукт гена *secY* способен к посттрансляционному функционированию [55]. Возможно, он представляет собой мембраносвязанный рецептор или каналобразующий белок [10], взаимодействующий с сигнальным пептидом бактерий.

Дополнительные детерминанты первичного сигнала [417]

В некоторых случаях наличие сигнального пептида у экспортируемых белков достаточно для переноса белков-пассажиров через цитоплазматическую мембрану. Примером может служить сигнальная последовательность у OmpA [900]. С другой стороны, оказалось, что транспорт белка наружной мембраны LamB возможен лишь при наличии определенной части последовательности зрелого полипептида [85]. Рэндолл и др. показали, что мальтозосвязывающий белок, синтезируясь на мембраносвязанных рибосомах, не переносится в периплазматическое пространство до тех пор, пока трансляция не пройдет примерно на 80% [1192]. Это указывает на определенную роль различных частей зрелой последовательности в инициации трансляции, хотя не исключаются и другие объяснения.

Исследования, проведенные на двух белках цитоплазматической мембраны, белке оболочки фага M13 и лидерной пептидазе, показывают, что для белков, кроме N-концевой сигнальной последовательности, по-видимому, необходимы какие-то структурные детерминанты. Сборка белка оболочки фага M13 (рис. 10.9) уже обсуждалась в разд. 10.3.2. Более характерным белком цитоплазматической мембраны является лидер-пептидаза; ее предполагаемая топология представлена на рис. 10.12. Этот фермент ответствен за протеолитическое отщепление сигнального пептида от большинства экспортируемых белков *E. coli*; его активный центр локализован на периплазматической стороне цитоплазматической мембраны. Молекула этого белка (323 аминокислотных остатка) имеет два транс-

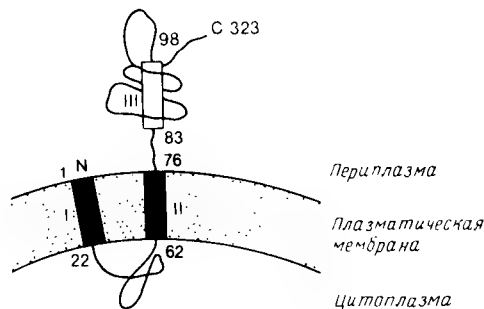


Рис. 10.12. Предполагаемая топология лидер-пептидазы из *E. coli* [1013]. Аминоокислотные остатки пронумерованы. Прямоугольниками обозначены гидрофобные сегменты. Первый гидрофобный участок не был обнаружен экспериментально, вывод о его существовании был сделан исходя из его гидрофобности. Наличие и ориентация второго гидрофобного участка установлены экспериментально и, по-видимому, он функционирует как внутренняя сигнальная последовательность. Третий гидрофобный сегмент имеет слабо выраженный гидрофобный характер и является частью периплазматического домена.

мембранных сегмента и большой С-концевой домен, экспонированный в периплазматическое пространство [275, 1013]. Делеция остатков 142—323 блокирует перенос неполного полипептида через цитоплазматическую мембрану [277], что согласуется с представлением о важной роли в переносе карбоксильной части молекулы (рис. 10.12). Полипептид, лишенный остатков 4—50, которые образуют первый трансмембранный сегмент, по-прежнему собирается в мембране, а второй трансмембранный сегмент играет роль сигнального пептида [275].

Таким образом, исследование некоторых белков *E. coli* свидетельствует о том, что для переноса через цитоплазматическую мембрану необходима информация, закодированная в такой структуре, которая находится за пределами сигнальной последовательности. Возможно, это просто отражает тот факт, что искусственные полипептидные конструкции, используемые в данных исследованиях, имеют конформацию, не способствующую переносу (например, они могут закрывать сигнальный пептид). А может быть, это связано с наличием характерных детерминант, необходимых для взаимодействия с компонентами механизма переноса.

Вторичные сигналы

Что направляет белки во внутреннюю мембрану, периплазматическое пространство или наружную мембрану — неизвестно. Генетические исследования [83, 1600], а также данные по конкурентным

взаимодействиям [192, 62] показывают, что многие из этих белков используют общий биохимический аппарат переноса. Результаты анализа сигнальных пептидов свидетельствуют о том, что небольшие изменения их гидрофобности и размера могут приводить к существенным изменениям в локализации переносимого белка [1352]. С другой стороны, сигнальная последовательность периплазматического белка может с успехом замещать сигнальную последовательность белка наружной мембраны [1462]; это означает, что информация о сборке заключена в зрелом белке наружной мембраны. Возможно, перемещение белка именно к плазматической мембране обусловлено просто наличием стоп-сигнала. Вспомним, что основные белки наружной мембраны, в том числе порины, лишены гидрофобных трансмембранных сегментов (рис. 8.7).

Использование синтетических сигнальных пептидов

Синтезированы пептиды, соответствующие сигнальной последовательности дикого типа, а также мутантные сигнальные пептиды белка LamB наружной мембраны и исследовано их взаимодействие с модельными фосфолипидными мембранами и везикулами *E. coli* [205, 148, 147]. Показано, что пептид, соответствующий сигнальной последовательности дикого типа, эффективно ингибирует *in vitro* перенос предшественников как периплазматического белка, так и белка наружной мембраны, а пептид, соответствующий мутантной сигнальной последовательности, дефектной по экспорту, не ингибирует перенос в бесклеточной системе. Это означает, что сигнальные пептиды узнают какой-то общий рецептор в цитозольной или мембранной фракции [205]. Кроме того, эффективность связывания этих пептидов с модельными мембранами (монослоем и бислоем) коррелирует с их способностью служить сигналом переноса. Корреляция между гидрофобностью сигнальной последовательности и способностью инициировать транслокацию обнаруживается и при использовании предшественника мальтозосвязывающего белка [334].

Эти данные согласуются с моделью, согласно которой первичная сигнальная последовательность определяет локализацию полипептидного предшественника в мембране путем неспецифических взаимодействий с липидным бислоем, после чего осуществляется более специфическое связывание с белковым рецептором. Сходная модель была предложена для амфифильных пептидных гормонов (разд. 3.7.1). Заметим, однако, что сигнальный пептид в животных клетках до его связывания с мембраной взаимодействует с каким-то растворимым рецептором (разд. 10.3.4). Какое значение для сигнального пептида имеет его способность связываться с липидами — остается неясным.

Другие сигнальные последовательности бактерий

Имеются данные о том, что у бактерий существуют сигналы, отличные от сигналов у *E. coli*. Особый интерес представляет уникальная сигнальная последовательность, содержащаяся в бактериородопсине *H. halobium*. Этот белок (рис. 3.8) синтезируется *in vivo* с N-концевым сигналом длиной 13 остатков, который в принципе может образовывать амфифильную α -спираль [1531]. Он сильно отличается от сигнальной последовательности *E. coli*, и о его функционировании почти ничего не известно.

Сигнальные последовательности импорта и сортировки в митохондриях [1289, 237]

Белки митохондрий и хлоропластов, информация о которых закодирована в ядре, синтезируются в виде водорастворимых предшественников на свободных рибосомах и *in vivo* переносятся к месту назначения после трансляции. В результате сортировки митохондриальные белки оказываются в наружной мембране, межмембранном пространстве, внутренней мембране или в матриксе (рис. 10.1). Эксперименты с использованием химерных полипептидов или полипептидов, полученных в результате делеций, показали, что, как правило, достаточная для импорта и сортировки информация содержится на N-конце. Большинство белков митохондрий и хлоропластов синтезируется с N-концевыми препоследовательностями, которые удаляются сигнальными пептидазами во время или после переноса. Эти препоследовательности содержат информацию, необходимую для импорта и сортировки. Например, первые 22 аминокислоты IV субъединицы цитохром с-оксидазы, присоединенные к дигидрофолатредуктазе мыши, детерминируют импорт цитозольного фермента в матрикс митохондрий [371]. В общем случае в отсутствие дополнительных сигналов сигнал импорта направляет белок-пассажир в матрикс. Это «укороченный» путь, аналогичный конститутивной секреции белков, импортируемых в эндоплазматический ретикулум. Дополнительные сигналы сортировки, как правило, тоже находятся в препоследовательности, за сигналом импорта. Например, если препоследовательность цитохрома с (рис. 10.13) присоединена к тетрагидрофолатредуктазе, то белок-пассажир локализуется в межмембранном пространстве [1289]. Даже в тех немногих случаях, когда отщепляемая сигнальная последовательность отсутствует (переносчик ADP/ATP), сигналы сортировки и импорта находятся на N-конце полипептида. Впрочем, в некоторых работах имеются указания на то, что какую-то роль в импорте митохондриальных белков играют последовательности, отличные от тех, которые расположены вблизи N-конца [1148, 1150].

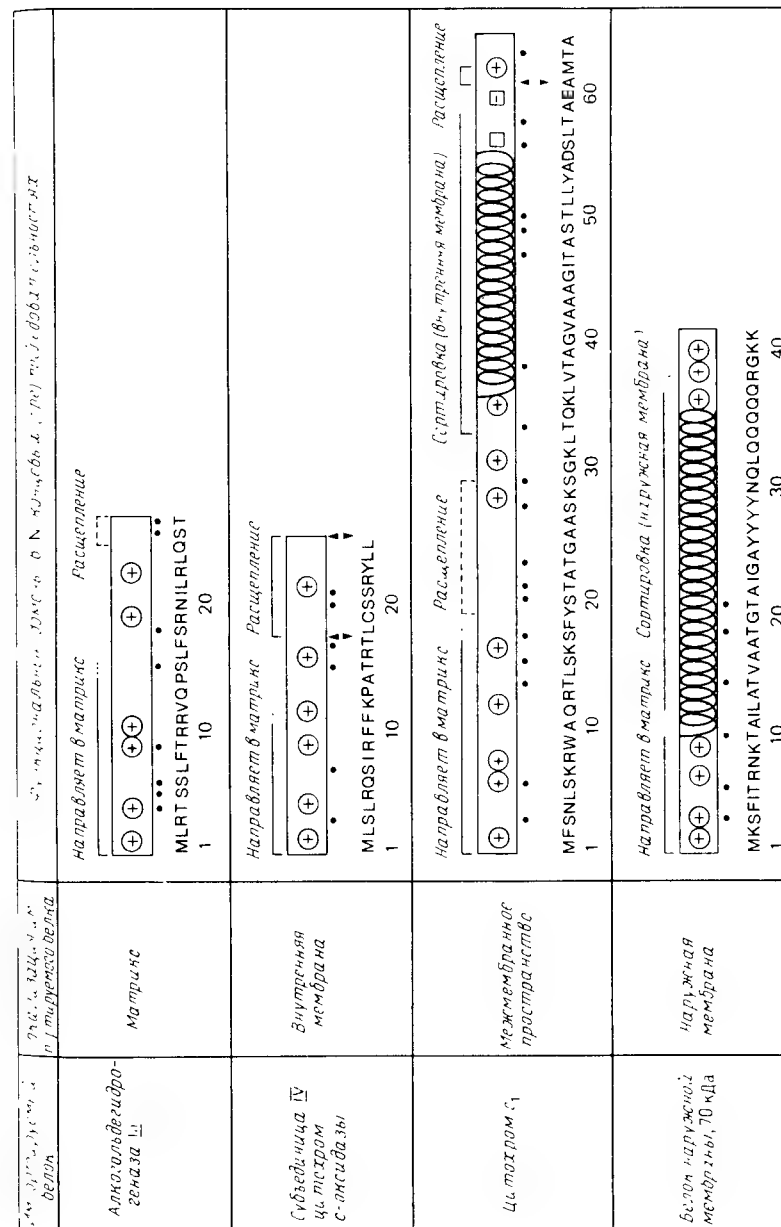


Рис. 10.13. N-Концевые сигналы сортировки в митохондриях белков, информация о синтезе которых содержится в митохондриях [1289]. Знаками (+) и (-) отмечены заряженные аминокислоты, точками — гидроксипролин, стрелками — пронизывающая мембрану стоп-последовательность переноса, которая действует как сигнал сортировки. Стрелками указаны сайты протеолитического расщепления.

На рис. 10.13 суммированы данные о структуре сигнальных последовательностей типичных митохондриальных белков. У всех них на N-конце находится последовательность, определяющая транспорт белков в матрикс, а также при необходимости содержится дополнительная сигнальная информация.

Белки наружной мембраны

Наиболее детально изучен белок наружной мембраны дрожжей с мол. массой 70 кДа [1289]. Как и другие белки наружной мембраны, он не содержит отщепляемого сигнального пептида, и сигнальной последовательностью, ответственной за его транспорт в матрикс, служит N-конец. Это было показано в опытах по присоединению первых 12 аминокислот исследуемого белка к цитозольному белку, в результате чего белок-пассажир оказывался в матриксе митохондрии. Сигнал сортировки, который определяет локализацию белка мол. массой 70 кДа в наружной мембране, по-видимому, представляет собой сегмент из 28 незаряженных аминокислот, примыкающий к сигнальной последовательности, ответственной за транспорт белка в матрикс. Делеция лишь двух из этих незаряженных остатков приводит к транспорту белка в матрикс. Заметим, что митохондриальный импорт, по-видимому, осуществляется через каналы, находящиеся в местах соединения внутренней и наружной мембран [1298, 1307] (см. модель на рис. 10.8). В отличие от примера, приведенного на рис. 10.8, сборка белка с мол. массой 70 кДа не требует наличия трансмембранного потенциала, что типично для белков наружной мембраны. Простейшая схема сборки белка с мол. массой 70 кДа состоит в том, что гидрофобный участок, закрепляющий белок в наружной мембране, играет роль стоп-сигнала переноса, в результате основная часть белка остается вне митохондрии. Сборка другого исследованного белка наружной мембраны, порина из *Neurospora crassa*, вероятно, осуществляется с помощью другого механизма. Этот белок не содержит гидрофобного участка и, подобно поринам бактерий, по-видимому, представлен трансмембранной β -структурой [761].

Межмембранное пространство

Типичным представителем белков, содержащихся в межмембранном пространстве, является цитохром b_2 [596]. Его препоследовательность состоит из 80 остатков, составляющих два разных участка. N-концевая часть препоследовательности служит сигналом, направляющим целый полипептид в матрикс. Этот процесс зависит от наличия потенциала на внутренней мембране. В резуль-

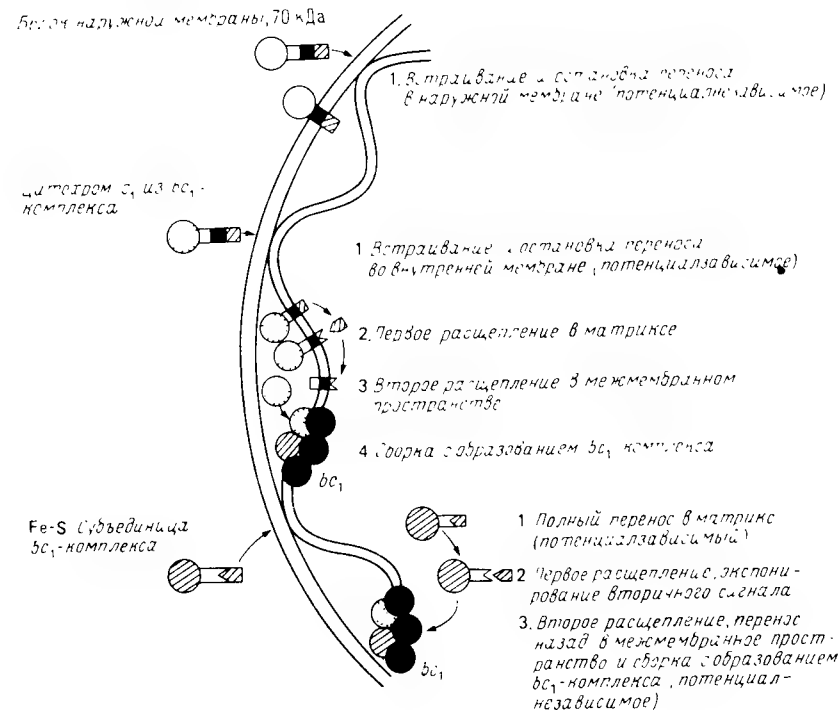


Рис. 10.14. Рабочие модели импорта и сортировки некоторых митохондриальных белков из цитоплазмы [1491]. Механизм, предложенный для цитохрома c_1 , обсуждается в работе [596].

тате протеолитического процессинга, осуществляемого сигнальной пептидазой в матриксе, N-концевой участок препоследовательности удаляется и освобождается вторая часть сигнала, которая направляет полипептид обратно через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство. Этот этап не требует наличия мембранного потенциала. В результате второго акта протеолиза на наружной поверхности внутренней мембраны образуется водорастворимая зрелая форма белка. Сходным образом происходит импорт железосодержащей субъединицы Риске bc_1 -комплекса, но в этом случае весь протеолитический процессинг осуществляется внутри матрикса (рис. 10.14) [595]. Заметим, что процесс переноса белков из матрикса очень похож на процесс экспорта белков из бактерий [596].

Для объяснения импорта цитохрома c_1 , другой субъединицы bc_1 -комплекса, были предложены два механизма. Один из них сходен с механизмом, описанным выше для цитохрома b_2 [596], другой представлен на рис. 10.14 [1491, 1490]. В этом случае пре-

последовательность весьма протяженная (61 остаток; рис. 10.13) и очень похожа на таковую у цитохрома b_2 . Предполагается, что белок, направляемый N-концевой сигнальной последовательностью, транспортируется в матрикс до тех пор, пока перенос не блокируется гидрофобным сегментом из 19 незаряженных остатков на C-конце препоследовательности. Белок закрепляется на внутренней мембране, как это схематически показано на рис. 10.14. Как только перенос цитохрома c_1 прекращается, две сигнальные пептидазы, одна в матриксе, а другая в межмембранном пространстве, отщепляют препоследовательность, в результате чего образуется зрелый белок, который собирается в мультисубъединичный bc_1 -комплекс. Зрелый белок, вероятно, фиксируется во внутренней мембране с помощью C-концевой гидрофобной спирали. Заметим, что механизм импорта цитохрома c в межмембранное пространство, по-видимому, уникален. В этом случае отщепляемая препоследовательность отсутствует; вероятно, белок имеет свой собственный специфический рецептор [1067].

Внутренняя мембрана

По-видимому, сигнал сортировки у многих белков внутренней мембраны, импортируемых из цитоплазмы, может быть заменен соответствующей гидрофобной последовательностью, выполняющей функции стоп-сигнала переноса. Об этом свидетельствует, в частности, локализация гибридного белка, полученного путем присоединения к карбоксильной части G-белка везикулярного stomatita сигнальной последовательности, определяющей транспорт в матрикс [1064]. Гибридный белок импортировался в митохондрию *in vitro* и закреплялся во внутренней мембране с помощью трансмембранного домена G-белка. Сегмент N-концевой последовательности, функционирующий как стоп-сигнал переноса во внутреннюю, но не в наружную мембрану, содержится также в ADP/ATP-переносчике [4].

Сигнальные последовательности в хлоропластах

Первичные сигналы сортировки хлоропластных белков, закодированных в ядре, сходны с сигналами, характерными для митохондриальных белков [237, 356]. Так, было показано, что препоследовательность одного из хлоропластных белков направляет белки-пассажиры в митохондрию дрожжей [237]. Каков механизм сортировки белков по разным органеллам при наличии как хлоропластов, так и митохондрий — неясно. Сортировка белков хлоропластов в самой органелле является даже более сложной проблемой,

чем в случае митохондрий. Хлоропластные белки могут находиться в любой из двух мембран оболочки или в стромах, они могут встраиваться в мембрану тилакоида или пересекать ее, проникая в полость тилакоида (рис. 10.1). Вторичные сигналы, по-видимому, локализованы внутри N-концевой препоследовательности в группах из отдельных доменов аналогично митохондриальным сигналам сортировки [237]. Таким образом, для того чтобы белки, закодированные в ядре, могли попасть в полость тилакоида, необходимы по крайней мере два сигнала: один для прохождения белка через оболочку с последующим образованием растворимого предшественника в стромах и второй для транспорта через мембрану тилакоида.

Структурные особенности последовательностей, ответственных за направление белков в матрикс

При сравнении сигнальных последовательностей, ответственных за транспорт белков в митохондрии, выявляется не какая-то специфическая последовательность, а скорее общая тенденция этих сигналов к образованию положительно заряженных амфифильных спиралей [1527]. Как правило, эти последовательности вообще не несут отрицательных зарядов или слабо заряжены, причем лизиновые и аргининовые остатки расположены таким образом, что при формировании α -спирали они оказываются в основном на одной из ее сторон, образуя область с четко выраженными гидрофобными свойствами (разд. 3.6.2). Такие амфифильные последовательности очень часто встречаются в растворимых белках. Показано, что внутренние последовательности из цитозольного фермента дигидрофолат-редуктазы, а также последовательности, образованные случайным образом из генома *E. coli*, будучи присоединенными к белку-пассажиру, инициируют транспорт этого белка в митохондрию [667, 59]. Роль таких сигналов могут играть многие искусственные последовательности [21]. Интересно отметить сходство между сигналом, ответственным за транспорт белка в митохондрию, и предполагаемой амфифильной спиралью, которая, по-видимому, образует «датчик напряжения» в ионных каналах (см. разд. 8.2.5). Очевидно, что для узнавания рецепторов, участвующих в импорте в митохондрию, существенны скорее некоторые особенности вторичной структуры, чем наличие характерных аминокислотных остатков. Как мы уже говорили, хорошую модель рецептора, способного связывать множество разнообразных пептидов, представляет антиген гистосовместимости HLA-A2 [104].

Показано, что синтезированные химическим способом пептиды, соответствующие митохондриальным сигнальным последовательностям, связываются с липидными би- и монослоями и образуют спираль в присутствии некоторых фосфолипидов и детергентов

[1239, 394, 1046]. Кроме того, один из синтезированных пептидов блокирует импорт предшественников митохондриальных белков, возможно связываясь со специфическими рецепторами [514]. Полагают, что сигнальная последовательность сначала вызывает концентрирование предшественника в мембранах, а затем связывание со специфическим рецептором в наружной мембране. Как видно из рис. 10.8, необходимым условием связывания является наличие трансмембранного потенциала на внутренней мембране. Исходя из предложенной модели амфифильный сигнальный пептид сначала связывается с поверхностью мембраны, а затем продвигается внутрь ее под действием разности потенциалов. Такая промежуточная структура положительно заряженной спирали, погруженной в мембрану, конечно, нестабильна. Однако, если энергетический барьер перехода в это состояние меньше, чем примерно 18 ккал/моль, то пептид все же может пересекать мембрану с приемлемой скоростью (одна аминокислота в секунду). Впрочем, это маловероятно, особенно если учесть высокую плотность гидроксильрованных аминокислот, обычно присутствующих в препоследовательностях помимо других положительно заряженных аминокислот. Согласно альтернативной модели, трансмембранный потенциал влияет на рецепторные белки или предполагаемый канал внутри мембраны, через который осуществляется перенос. Отметим, что для переноса в строму хлоропласта не требуется наличия трансмембранного потенциала, хотя сигналы, ответственные за транспорт белков в эти органеллы, сходны.

10.3.3. СИГНАЛЬНЫЕ ПЕПТИДАЗЫ

Для удаления временных N-концевых сигнальных пептидов необходимы специфические белки. Наиболее полно охарактеризованы сигнальные протеазы из *E. coli*. Большинство экспортируемых белков *E. coli* содержат сигнальный пептид, который отщепляется на периплазматической поверхности внутренней мембраны с помощью лидер-пептидазы; ее структура представлена на рис. 10.12. Для переноса белков через внутреннюю мембрану эта пептидаза не нужна, но она необходима для высвобождения экспортируемого белка из цитоплазматической мембраны [276]. *In vitro* очищенный фермент мог функционировать, будучи включенным в липосомы [1090]. Специфичность расщепления весьма высока, но не определяется исключительно аминокислотной последовательностью вблизи сайта расщепления [333, 1530]. Сигнальная пептидаза, функционирующая в эндоплазматическом ретикулуме, имеет ту же специфичность, что и соответствующий фермент *E. coli* [1530], что неудивительно, если учесть сходство сигнальных последовательностей. Бы-

ла очищена сигнальная пептидаза из микросом эукариот. Показано, что она ассоциирована с другими полипептидами, возможно имеющими отношение к механизму переноса [400].

У *E. coli* имеется вторая сигнальная пептидаза, участвующая в процессинге пролипопротеинов. Эти полипептидные компоненты оболочки *E. coli* замечательны тем, что при созревании их N-конец модифицируется с помощью глицерида (разд. 3.8). Пролипопротеиновая сигнальная пептидаза также находится в цитоплазматической мембране [679]. После отщепления сигнальный пептид остается в цитоплазматической мембране и разрушается с помощью мембраносвязанного фермента протеазы IV [674].

В митохондриях и хлоропластах должно присутствовать несколько сигнальных пептидаз, поскольку процессинг происходит более чем в одном компартменте (рис. 10.14). Растворимую пептидазу из митохондриального матрикса удалось частично очистить, но охарактеризована она не полностью [1289].

10.3.4. РАСТВОРИМЫЕ И МЕМБРАНОСВЯЗАННЫЕ БЕЛКИ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПЕРЕНОСА

Идентифицировано несколько цитозольных и мембраносвязанных белковых компонентов, необходимых для переноса. Наиболее детально охарактеризованы белковые факторы, участвующие во встраивании белков в эндоплазматический ретикулум млекопитающих (рис. 10.15).

1. *Сигнал-распознающая частица (СРЧ)*. Это растворимый рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из шести разных белков и молекулы 7S-РНК [207, 1548]. СРЧ необходима для инициации переноса. Она связывается с сигнальной последовательностью образующегося полипептида во время его синтеза на рибосоме. Для препролактина, например, константа диссоциации составляет 1 нМ [1196]. С помощью метода фотохимического сшивания был идентифицирован один из полипептидов (54 кДа), непосредственно взаимодействующий с сигнальной последовательностью предшественника [1579]. По некоторым данным, полученным для бесклеточных систем, связывание СРЧ ингибирует трансляцию или вызывает ее задержку. Впрочем, не исключено, что этот феномен является артефактом [1288]; во всяком случае, как было показано на модельных опытах, его не обязательно привлекать для объяснения кинетики переноса белков *in vivo* [1196]. Одна из вероятных функций СРЧ состоит в предотвращении неправильного свертывания образующегося полипептида, которое может блокировать перенос (например, из-за экранирования сигнальных последовательностей). Задержка трансляции должна уменьшать вероятность такого ошибочного свертывания и, следовательно, увеличивать эффективность переноса белков.

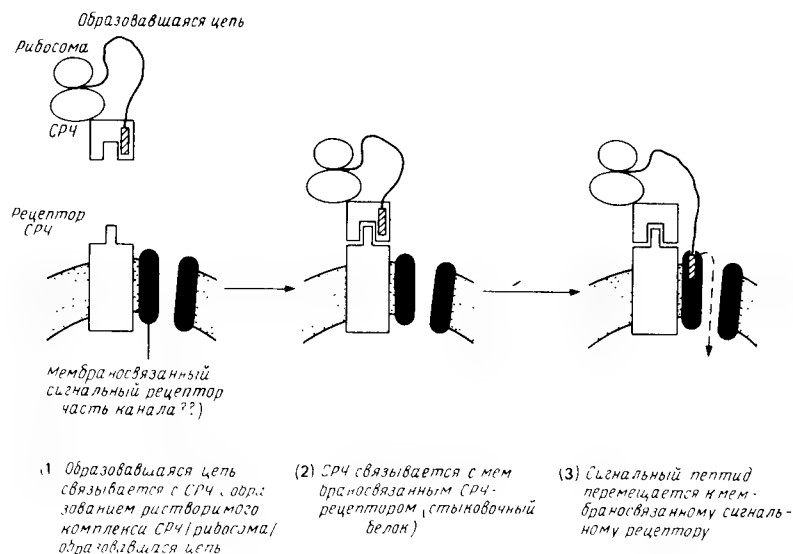


Рис. 10.15. Схематическое изображение ранних стадий котрансляционного переноса полипептида через эндоплазматический ретикулум млекопитающих. Сигналь-распознающая частица и SRP-рецептор (стыковочный белок) хорошо охарактеризованы. Мембраносвязанный сигнальный рецептор изображен как компонент канала через мембрану, но существование таких каналов и роль сигнального рецептора не бесспорны. После образования комплекса между сигнальным пептидом и мембраносвязанным рецептором на стадии 3 SRP и стыковочный белок могут диссоциировать и принимать участие в новом цикле, оставляя мембраносвязанную рибосому и образовавшуюся цепь присоединенными к аппарату переноса.

Некоторые небольшие белки (<8,5 кДа) транспортируются в эндоплазматический ретикулум независимо от SRP. В их число входят препропептид GLa лягушки [1297], препромелиттин [1033] (оба они являются предшественниками секретируемых белков) и пробелок оболочки фага M13 [1577]. Во всех этих примерах конформация предшественника такова, что белки должны оставаться способными к переносу даже в отсутствие SRP и рибосом [1033].

2. Рецептор SRP, или стыковочный белок. Комплекс SRP/рибосома/образующаяся полипептидная цепь транспортируется в шероховатый эндоплазматический ретикулум, преодолевая энергично сильного взаимодействия между SRP и мембраносвязанным рецептором SRP, называемым также стыковочным белком [656, 823, 1419]. Рецептор SRP содержит субъединицу с мол. массой 73 кДа, присоединенную N-концом к мембране. Вероятно, рибосома также связывается со специфическими рецепторами, присутствующими в мембране [1620].

3. Рецептор сигнальной последовательности. Сигнальная последовательность на образующейся полипептидной цепи перемещается от SRP ко второму рецептору, находящемуся в мембране и называемому рецептором сигнальной последовательности [1578, 1547]. Об этом свидетельствуют результаты опытов по фотохимическому сшиванию, в которых используется метка, связанная с сигнальной последовательностью препролактина. Предполагаемый мембраносвязанный рецептор представляет собой гликопротеин с мол. массой 35 кДа. Возможно, он образует часть канала, через который осуществляется перенос. С помощью такого же подхода с использованием поперечной сшивки и синтетического сигнального пептида был обнаружен еще один кандидат на роль рецептора сигнальной последовательности (45 кДа) [1233]. Связь между этими двумя белками неизвестна и функции их до конца не установлены. Как только образовавшаяся полипептидная цепь связывается с мембраносвязанным рецептором, SRP и ее рецептор могут освободиться от рибосомы и принять участие в новом цикле. О предполагаемом канале, участвующем в переносе, ничего не известно; очистка его является довольно сложной задачей.

Было показано, что для переноса белков через эндоплазматический ретикулум дрожжей необходимы растворимые факторы [589, 1556], однако их сходство с SRP не установлено. Перенос различных секретируемых белков в дрожжах может происходить после завершения трансляции, поэтому не исключается, что в этих случаях образующиеся полипептидные цепи взаимодействуют с мембраносвязанным рецептором сигнальной последовательности [1547]. По-видимому, растворимые белковые факторы необходимы и для экспорта белков в *E. coli* [1034], а также для импорта белков в митохондрию [1152], но охарактеризовать их не удалось. Было показано, что продукт гена *secY*, необходимый для экспорта белков в *E. coli*, является мембраносвязанным, но его функция остается неизвестной [10].

Определенные успехи были достигнуты при идентификации рецептора на наружной митохондриальной мембране, необходимого для импорта белков. Опыты по связыванию с порином показали, что на мембране имеется некий рецептор с высоким сродством (константа диссоциации $\sim 10^{-8}$ М), который участвует в импорте ADP/АТФ-переносчика, белка внутренней мембраны [1147]. Идентифицированы два разных полипептида — компонента рецептора сигнальной последовательности наружной мембраны [513, 1089]. При этом использовались два метода: блокирование импорта белков антителами [1089] и химическое сшивание с синтетическим сигнальным пептидом [513]. Интересно, что импорт в митохондрии, по-видимому, не связан с наружной мембраной, которая удаляется при образовании митопластов. Это наблюдение позволяет предполо-

жить, что другой рецептор сигнальной последовательности находится во внутренней мембране [1088].

10.3.5. СБОРКА МУЛЬТИСУБЪЕДИНИЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ И ОБНОВЛЕНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

После встраивания мембранного полипептида в мембрану он еще должен приобрести правильную конформацию, обеспечивающую его биологическую активность, а если речь идет о мультисубъединичных комплексах, то связаться с другими белками. В частности, у эукариот при этом должны произойти различные ковалентные модификации, например гликозилирование, ацилирование, сульфирование или образование дисульфидных связей. Даже когда такие модификации не являются необходимыми, процесс конформационного созревания может быть медленным и отстоять по времени от встраивания в мембрану.

Например, у *E. coli* четко наблюдается сборка стабильных тримеров обоих белков, LamB [1533] и OmpF [66], после включения соответствующих мономеров в наружную мембрану, при этом созревание LamB занимает около 5 мин. В эукариотических клетках гликопротеин гемагглютинина вируса гриппа, прежде чем попасть из эндоплазматического ретикула в комплекс Гольджи, должен сформировать правильную четвертичную структуру, соответствующую зрелой форме [509]. Несвернутые молекулы гемагглютинина остаются в эндоплазматическом ретикуле. Образование тримеров занимает примерно 7—10 мин [509]. Сходная олигомеризация наблюдается также для G-белка вируса везикулярного стоматита [785].

Сборка многих мультисубъединичных комплексов, содержащих разные субъединицы, тоже, по-видимому, происходит в эндоплазматическом ретикуле. Примером служит никотиновый ацетилхолиновый рецептор [1359], который содержит две α -субъединицы и по одной β -, γ - и δ -субъединице (рис. 8.8). С помощью антител можно различить отдельные формы α -субъединицы: 1) начальный продукт, встраивающийся в эндоплазматический ретикулум; эта форма не может связывать антагонист α -бунгаротоксин; 2) форма, способная связываться с α -бунгаротоксином и образующаяся через несколько минут после завершения трансляции в эндоплазматическом ретикуле; 3) зрелый рецептор, содержащий все субъединицы ($\alpha_2\beta\gamma\delta$), который обнаруживается через 15 мин после завершения трансляции в эндоплазматическом ретикуле; 4) готовый рецептор на клеточной поверхности, появляющийся спустя примерно 2 ч после трансляции. Созревание включает образование дисульфидных связей, олигосахаридный процессинг и ацилирование при участии

жирных кислот. Вероятно, определенную роль в сборке, происходящей в комплексе Гольджи, играет фосфорилирование субъединиц [1243].

Решающим фактором процесса сборки является, вероятно, стабильность таких стехиометрических комплексов, как ацетилхолиновый рецептор. По-видимому, в некоторых системах отдельные субъединицы синтезируются в значительном избытке и не образуют стабильных комплексов, а подвергаются протеолитическому расщеплению [887]. Об этом свидетельствуют результаты, полученные при изучении некоторых мультисубъединичных комплексов, в частности Т-клеточного рецептора антигена [994].

Изучался также процесс созревания и сборки структуры, образующей Na-канал [1300]. Необходимым условием созревания является образование дисульфидной связи между α - и β_2 -субъединицами (разд. 8.2.5), однако это событие происходит спустя примерно 1 ч после трансляции и транспорта субъединиц в аппарат Гольджи, а рецептор появляется на клеточной поверхности через 4 ч после трансляции. В этом случае свободные α -субъединицы не подвергаются быстрой деградации, а сохраняются в межклеточном пуле и, возможно, используются в дальнейшем в качестве предшественников для формирования канала в растущих нейронах.

Созревшие мембранные белки подвергаются непрерывному обновлению. Период полубонового обновления Na-канала составляет около 30 ч [1300], что типично для поверхностных белков. Обновление большой субъединицы Na/K-АТФазы в растущих клетках в культуре происходит за время 20 — 40 ч [727, 1429]. По-видимому, деградация по крайней мере некоторых белков происходит в лизосомах. В качестве примера можно привести цитохром P450, содержащийся в эндоплазматическом ретикуле [931].

Дополнение 10.3. Два интересных примера обновления мембранных белков

Стабильность белков в клетке определяется множеством различных факторов [1205]. Особенно интересным примером деградации мембранных белков является гидроксиметилглутарил-CoA-редуктаза [512, 768]. Этот фермент находится в гладком эндоплазматическом ретикуле и регулирует эндогенный синтез холестерина. Деградация его происходит довольно быстро (~2—4 ч) и ускоряется при взаимодействии с холестерином. Для ускорения процесса необходимо наличие мембраносвязанного домена фермента [512]. При определенных условиях в культуре ооцитов китайского хомячка наблюдается сверхпродукция (более 500 раз) этого фермента. В

результате образуются мембранные трубочки, занимающие 15% клеточного объема и содержащие другие мембранные белки, а также липиды [768]. Добавление холестерина приводит к быстрой деградации избытка мембран, что говорит о координации синтеза и деградации мембранных компонентов.

Другим интересным примером селективного метаболизма мембранных белков является гербицидсвязывающий белок (называемый также белком D1 или Q_B) с мол. массой 32 кДа из тилакоидов хлоропластов. Этот белок синтезируется как предшественник, созревая внутри отдельных ламелл тилкоида, не собранных в граны, и является частью фотосистемы II в ламеллах, входящих в граны [940]. На свету скорость деградации этого полипептида в мембране намного выше, чем других белков [630]. Причина этого явления неизвестна; возможно, оно связано с тем, что в фотосистеме II на свету происходят какие-то повреждения.

10.4. Биосинтез и распределение мембранных липидов [298]

Как мы отмечали в гл. 1, в мембранах эукариотических клеток обнаружено огромное количество разных липидов, причем они не распределены равномерно по разным клеточным мембранам. Эта неравномерность относится к распределению как полярных головок (табл. 1.3), так и ацильных хвостов (табл. 1.6). Например, степень ненасыщенности фосфолипидов в общем случае уменьшается при переходе от эндоплазматического ретикулума к комплексу Гольджи и затем к плазматической мембране [298]. Для животной клетки среднее молярное отношение холестерол/фосфолипиды равно 0,3—0,4, при этом для плазматической мембраны оно гораздо выше (0,8—0,9), чем для других мембран, таких, как шероховатый эндоплазматический ретикулум (около 0,1). Кроме того, для многих мембран характерно неравномерное распределение липидов и по разным половинам бислоя (см. гл. 4).

Вопрос о механизме создания и поддержания такой асимметрии очень интересен и сложен. Напомним, что многие мембраны эукариотических клеток участвуют в эндоцитозе и экзоцитозе, при которых от одних мембран везикулы отпочковываются, а с другими сливаются. Этот процесс селективен для белков, которые транспортируются с помощью везикул, но почему-то не приводит к идентичности липидного состава вовлекаемых в него мембран. Причина этого явления неизвестна, выяснены лишь некоторые его аспекты. Рассмотрим, где синтезируются мембранные липиды, а затем обсудим, как они могут транспортироваться к месту назначения.

10.4.1. ГДЕ СИНТЕЗИРУЮТСЯ МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ? [298, 1498, 1235]

Прокариоты

У *E. coli* весь синтез фосфолипидов протекает в плазматической мембране [1235]. В общих чертах этот процесс представлен на рис. 10.16. Жирные кислоты синтезируются в виде предшественников, ковалентно связанных с белком — переносчиком ацила, а затем включаются в мембрану путем ацилирования с образованием CDP-диацилглицерола. Два ацилирующих фермента (рис. 10.16) проявляют предпочтение к ненасыщенным жирнокислотным группам, находящимся в положении *sn*-2. На уровне CDP-диацилглицерола происходит разветвление процесса, после чего образуется фосфатидилсерин или фосфатидилглицерол (рис. 10.16).

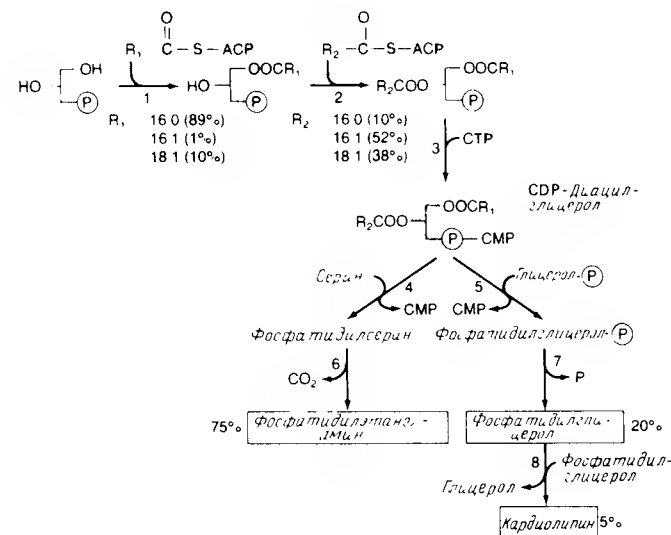


Рис. 10.16. Общая схема биосинтеза липидов у *E. coli* [1235]. На уровне CDP-диацилглицерола происходит разветвление пути и синтезируется либо фосфатидилэтаноламин, либо фосфатидилглицерол и кардиолипин. Указано содержание липидов в мембране (в %). Заметим, что фосфатидная кислота и фосфатидилсерин являются необходимыми интермедиатами, но не накапливаются в клетках дикого типа. Реакции катализируются следующими ферментами: *стадия 1*, *sn*-глицерол-3-фосфатацилтрансфераза; *стадия 2*, 1-ацил-*sn*-глицерол-3-фосфатацилтрансфераза; *стадия 3*, CDP-диацилглицеролсинтаза; *стадия 4*, фосфатидилсеринсинтаза; *стадия 5*, фосфатидилглицеролфосфатсинтаза; *стадия 6*, фосфатидилсериндекарбоксилаза; *стадия 7*, фосфатидилглицеролфосфатфосфатаза; *стадия 8*, кардиолипинсинтаза.

шествления этой последовательности реакций должен происходить перенос липидов между эндоплазматическим ретикуломом и митохондрией. Фосфатидилэтаноламин может превращаться в фосфатидилхолин с помощью одной или двух метилаз, содержащихся в эндоплазматическом ретикуле [1118, 769], но этот путь обычно не является главным.

Двумя липидными компонентами, которые локализуются в основном в плазматической мембране, являются сфингомиелин и холестерол. По-видимому, сфингомиелин образуется в некоторых клетках путем переиоса фосфатидилхолиновой группы от фосфатидилхолина на церамид с помощью какого-то фермента, присутствующего в плазматической мембране. Напротив, несмотря на то, что холестерол концентрируется в основном в плазматической мембране, он синтезируется при участии ферментов, содержащихся в гладком эндоплазматическом ретикуле и, возможно, в пероксисомах [1451].

10.4.2. ТРАНСПОРТ ЛИПИДОВ ОТ МЕСТА ИХ СИНТЕЗА [298, 1520]

Перенос мембранных липидов от места их синтеза к месту назначения осуществляется при помощи двух процессов: 1) трансмембранного флип-флоп-перехода; 2) внутримембранного транспорта. Данные о скорости флип-флопа обсуждались в разд. 4.4.3 в связи с асимметрией мембраны. Скорость флип-флоп-перехода фосфолипидов особенно велика для тех мембран, в которых происходит биосинтез липидов; ее характерное время составляет величину порядка нескольких минут. Имеются данные о том, что этот процесс осуществляется при участии белков и, возможно, требует гидролиза АТФ. Было также показано, что холестерол способен к быстрому спонтанному флип-флоп-переходу [298]. Следовательно, транспорт через мембрану эндоплазматического ретикула из цитозоля в просвет происходит довольно быстро.

В транспорте липидов от одной клеточной мембраны к другой участвуют несколько процессов. В разных случаях наиболее важным может оказаться какой-то один из них.

1. Самопроизвольный перенос липидов путем диффузии мономерных липидных единиц через водную фазу.
2. Диффузия липидов через постоянные или временные места соединения двух контактирующих мембран.
3. Транспорт с участием белков, катализируемый или белками, облегчающими высвобождение липидов из донорной мембраны, или липидсвязывающими белками.
4. Транспорт с участием везикул, при котором липиды, как и мембранные белки, транспортируются в ходе непрерывного отпо-

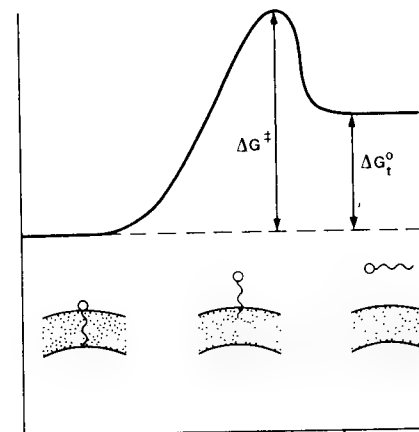


Рис. 10.18. Профиль свободной энергии для лимитирующей скорости десорбции липида из бислоя [1154]. Заметим, что при равенстве других параметров высота активационного барьера сольубилизации будет расти пропорционально стандартной свободной энергии переноса в воду, причем свободная энергия связана с критической концентрацией мицеллообразования (разд. 2.3.2).

чковывания и слияния с мембранами внутриклеточных везикул. Этот процесс может быть энергозависимым.

Рассмотрим вначале, что известно о самопроизвольной диффузии мембранных липидов между мембранами [1154, 298]. Как показывают многочисленные исследования, липиды могут самопроизвольно перемещаться между мономеллярными везикулами или между фосфолипидными везикулами и биомембранами. В большинстве случаев (но не всегда [1044]) при этом происходит десорбция мономерных липидов с поверхности донорной мембраны и свободная диффузия через водную среду к акцепторной мембране. Лимитирующим этапом (по крайней мере при избытке акцепторных мембран) является высвобождение липидов из донорной мембраны. В этих условиях характерное время переноса зависит от величины свободной энергии десорбции (рис. 10.18). Ясно, что менее водорастворимые липиды (т. е. липиды с низкой критической концентрацией мицеллообразования) должны преодолевать при десорбции более высокий энергетический барьер, а следовательно, их перенос должен осуществляться медленнее. Скорость переноса зависит не только от гидрофобности переносимого липида, но и от состава и физического состояния донорного бислоя [153, 63, 1618]. Например, ганглиозид GM₁, находясь в фосфатидилхолиновых везикулах, существует в монодисперсном состоянии. Благодаря наличию гидрофильных полярных групп он не совершает флип-флоп-переходов че-

рез мембрану везикул, но характерное время его переноса везикулами составляет около 40 ч при 45 °C [153]. Напротив, нейтральные ганглиозиды, лишённые остатков сиаловой кислоты (например, асиало-GM₁), образуют в везикулах гелеобразный кластер, и характерное время их переноса составляет около 500 ч. Смесь холестерина и фосфолипидов в везикулах тоже образует сложные фазы (разд. 2.42.), и это может влиять на кинетику переноса холестерина [63]. Стабилизация холестерина в мембране могла бы происходить за счет благоприятных взаимодействий со специфическими фосфолипидами [1618, 1557], например со сфингомиелином.

В табл. 10.2 приведены характерные времена переноса некоторых мембранных липидов. На одном конце шкалы находятся эфиры холестерина, которые являются в высшей степени неполярными и не переносятся между мембранами с помощью диффузии мономеров. На другом конце — лизофосфолипиды, очень быстро мигрирующие между мембранами. Обычно характерное время переноса холестерина составляет 1 — 2 ч. Таким образом, возникает вопрос, как поддерживается уникальное распределение липидов в различных мембранах.

Перенос новосинтезированного холестерина из эндоплазматического ретикулума в плазматическую мембрану осуществляется всего за 10 мин [298]. На процесс оказывают влияние агенты, блокирующие бноэнергетические реакции в клетке, например цианид. Эти и другие данные свидетельствуют о том, что внутриклеточный транспорт холестерина является энергозависимым процессом и протекает при участии везикул. В принципе он может перевесить любой спонтанный перенос. Однако единого мнения на этот счет не выработано. Серьезной проблемой является то, что оценки доли холестерина, присутствующего в плазматической мембране, от общего его количества в клетке сильно варьируют (от 25 до 95%) [1493]. На первый взгляд кажется, что количество холестерина, поступающего в некоторые клетки и выходящего из них, можно оценить, используя данные о скорости самопроизвольной диффузии мономеров [1154], однако неясно, пригодны ли в данном случае механизм спонтанного переноса и указанные скорости.

Характерное время переноса фосфолипидов из фосфолипидных везикул гораздо больше, чем холестерина (табл. 10.2). Например, для дипальмитоилфосфатидилхолина оно составляет 83 ч при 37° в случае везикул из димиристоилфосфатидилхолина [1154]. Скорость переноса фосфолипидов с помощью этого механизма слишком мала, чтобы соответствовать реальным скоростям межмембранного транспорта.

Таблица 10.2. Характерное время переноса фосфолипидов из фосфолипидных везикул¹⁾ [1154, 153]

Соединение	Характерное время
Холестерололеат	10 ⁷ ч (по оценкам)
Холестерол	1 — 2 ч
Дипальмитоилфосфатидилхолин	83 ч
1-Пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин	63 ч
Димиристоилфосфатидилхолин	2 ч
Пальмитоиллизофосфатидилхолин	< 0,05 ч
Ганглиозид GM ₁	40 ч (45°C)
Асиало-GM ₁	580 ч. (45°C)

¹⁾ Эксперименты проводились при 37 °C (если не оговорено иное). Состав донорных везикул в этих опытах был неодинаков. Характерное время определяется лимитирующей стадией десорбции липида из донорной везикулы.

Прокариоты

Остановимся вначале на переносе фосфолипидов в случае грам-отрицательных бактерий. Это относительно простая система, поскольку в ней имеются только две мембраны [1235]. Фосфолипиды синтезируются в плазматической мембране и должны транспортироваться в наружную мембрану [1520]. Имеются данные о том, что между этими мембранами осуществляется быстрый обмен липидами. Так, фосфатидилэтаноламин достигает наружной мембраны за характерное время ~ 3 мин. В этом процессе не участвуют белки, липиды или АТФ, но он каким-то образом зависит от протондвижущей силы. Липиды, внедрившиеся в наружную мембрану, могут также быстро перемещаться к внутренней мембране; это относится даже к фосфатидилхолину, который в норме не обнаруживается в *E. coli*. Таким образом, процесс, по-видимому, не является специфическим. Тем не менее у мутантного штамма с дефектной диацилглицеролкиназой диацилглицерол накапливается в плазматической мембране и к наружной мембране не транспортируется.

Механизм липидного обмена между этими двумя мембранами неизвестен, но обычно полагают, что внутренняя и наружная мембраны имеют места соединения или области адгезии. По-видимому, именно через эти участки и происходит диффузия липидов. Здесь

же могут концентрироваться белки, экспортируемые к наружной мембране.

Эукариоты

Механизм распределения фосфолипидов в эукариотических клетках гораздо более сложен. Единственным фосфолипидом, который локализуется исключительно в месте своего синтеза, в митохондриях, является кардиолипин. Как показывают многочисленные эксперименты, внутриклеточный транспорт фосфолипидов осуществляется значительно быстрее, чем если бы он определялся самопроизвольной диффузией в водной среде [298, 1520]. Например, перенос новосинтезированного фосфолипида от эндоплазматического ретикула к митохондриям в клетках печени крысы происходит всего за несколько минут. Поскольку декарбоксилаза, катализирующая превращение фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин, содержится в митохондриях (рис. 10.17), данные о скорости этой реакции могут использоваться для контроля за переносом фосфатидилсерина из эндоплазматического ретикула в митохондрию. Показано, что скорость переноса весьма высока и процесс ингибируется азидом и агентами, блокирующими биоэнергетические реакции. Обнаружено также, что новосинтезированный фосфолипид в течение нескольких минут транспортируется к плазматической мембране, хотя скорость переноса очень сильно зависит от самого липида и типа клетки [298, 1520]. В некоторых случаях транспорт липидов блокируется ингибиторами биоэнергетических реакций (энергетическими ядами) и/или агентами, разрушающими цитоскелет. Общепринято, что скорость переноса липидов выше скорости диффузии.

Одним из способов, позволяющих облегчить перенос фосфолипидов между мембранами, является участие в этом процессе белков. Выделен целый ряд водорастворимых белков, участвующих в межмембранном переносе фосфолипидов *in vitro* [200]. Все они имеют липидсвязывающие участки и образуют водорастворимые комплексы с фосфолипидами. Эти белки облегчают обмен липидов «один к одному» между мембранами путем переноса мономеров. В одних случаях (например, для фосфатидилхолинспецифического белка переноса из печени быка) связывание липидов происходит с высокой специфичностью и сродством [1492], в других сродство и специфичность относительно низки [1066]. В принципе при низком сродстве способность белка катализировать перенос липидов от одной мембраны к другой должна повышаться, поскольку белок при этом может возвращаться к донорной мембране, имея незанятый липидсвязывающий участок. Белки, переносящие фосфолипиды, были выделены не только из животных клеток, но и из бактерий [1418] и клеток растений [126]. Очищены белки, связывающиеся с

гликолипидами [1284] и длинноцепочечными жирными кислотами [141].

К сожалению, функция белков, переносящих фосфолипиды, до сих пор не продемонстрирована *in vivo*, поэтому неясно, играют ли они физиологическую роль во внутриклеточном переносе фосфолипидов. Не исключено, что этот перенос опосредуется везикулами, а возможно, функционируют оба механизма.

Важно понять, что так или иначе распределение фосфолипидов среди различных клеточных мембран детерминировано белками. Если распределение липидов равновесно, то оно определяется сродством белков, присутствующих в разных мембранах, к липидам. Смещение в распределении некоторых липидов из-за взаимодействия их с белками может влиять на распределение других липидов, например холестерина [1557, 1618]. Если распределение липидов неравновесно, то липидный состав разных мембран будет определяться скоростью транспортировки липидов к мембранам и от них [1006], но и в этом случае кинетика процесса будет зависеть от участия в нем определенных белков.

10.4.3. ОБНОВЛЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ [298, 1235]

Данные о скорости обновления липидов весьма скудны, известно лишь, что она весьма велика. В животных клетках половина всех фосфолипидов обновляется на протяжении одного или двух клеточных делений. Скорость обновления полярной и неполярной частей фосфолипидной молекулы неодинакова. По-видимому, это связано с действием внелизосомных фосфолипаз и ацилтрансфераз, которые вызывают перестройку внутриклеточных фосфолипидов *in situ*. Сфинголипиды расщепляются в лизосомах, и когда процесс их деградации нарушается, возникает патологическое состояние. Например, при болезни Ниманна—Пика происходит накопление сфингомиелина из-за недостатка лизосомного фермента сфингомиелиназы. Деградация гликофинголипидов *in vivo* также происходит в лизосомах, как полагают, с участием белков, которые специфически связываются с определенными липидами (например, с ганглиозидом GM₁) и, вероятно, растворяют их [1611].

У *E. coli* имеются по крайней мере 10 деградирующих ферментов, которые могут участвовать в процессе обновления фосфолипидов [1235], однако об их функциях *in vivo* известно немного. При экспоненциальном росте скорость обновления глицерольного остова и жирнокислотных цепей мала; по-видимому, невелика и скорость обмена ацильных групп [1235, 1234]. Однако обновление глицерофосфатной головки фосфатидилглицерола происходит необычайно быстро. Это связано с использованием фосфатидилглицерола в качестве донора *sn*-глицерол-1-фосфата для синтеза олигосахаридов

мембранного происхождения [686]. Эти олигосахариды содержатся в периплазматическом пространстве и играют роль в осмотической адаптации организма. В ходе реакции происходит превращение фосфатидилглицерола в диацилглицерол, который затем превращается с помощью диацилглицеролкиназы [1545] в фосфатидную кислоту.

10.5. Изменения липидного состава мембран в ответ на изменения условий окружающей среды [252]

Из всего сказанного ясно, что о механизме контроля липидного состава клеточных мембран известно очень мало. Одно из минимальных требований состоит в том, что мембранные липиды должны образовывать стабильный бислой, находящийся в жидкокристаллическом состоянии. Механизмы, обеспечивающие изменение липидного состава мембран в ответ на изменения условий окружающей среды, имеют многие организмы. Лучше всего изучен механизм тепловой адаптации *E. coli*.

1. *Тепловая адаптация E. coli* [1235]. При выращивании *E. coli* в условиях низких температур наблюдается изменение жирнокислотного состава в сторону большего содержания ненасыщенных жирных кислот. Это способствует поддержанию мембраны в текучем состоянии и позволяет клеткам выжить при экстремальных температурах. Преобладающими остатками жирных кислот в *E. coli* (рис. 10.16) являются пальмитоил (16:0), пальмитолеил (16:1) и *цис*-ваксеноил (18:1). При низких температурах в бислой включается больше *цис*-ваксеновой кислоты, а содержание пальмитолеиновой кислоты остается постоянным. Связано это с функционированием одного из двух ферментов, которые катализируют удлинение жирнокислотных цепей. При низких температурах фермент 3-кетосинтаза II более активно превращает пальмитолеиновую кислоту в *цис*-ваксеновую, увеличивая пул ненасыщенных жирных кислот, включаемых в фосфолипиды.

2. *Адаптация к повышению давления*. Жирнокислотный состав барофильной морской бактерии NPT3 зависит от давления [321]. При изменении давления в мембранах может также происходить фазовый переход, и эта адаптация, как и в предыдущем случае, позволяет организму выжить. При повышении давления содержание в мембранах ненасыщенных жирных кислот увеличивается, и благодаря особенностям их упаковки мембрана остается в жидкокристаллическом состоянии. Аналогичные результаты были получены при изучении фосфолипидов митохондрий из клеток печени глубоководных океанических рыб [251].

3. *Исследования Achleplasma laidlawii*. Этот организм является

микоплазмой. У него нет клеточной стенки, а имеется единственная плазматическая мембрана. Эта особенность весьма ценна для лабораторных исследований, поскольку в мембрану могут включаться экзогенные жирные кислоты, которые легко выделять и изучать. Основными липидными компонентами являются моноглицериды (МГДГ) и диглицериды (ДГДГ). Как упоминалось в гл. 2, из-за различий в размере полярной головки выделенные МГДГ образуют обратимую гексагональную фазу, а ДГДГ — стабильный бислой. Фазовые свойства мембран *A. laidlawii* зависят прежде всего от соотношения между МГДГ и ДГДГ [1582]. Липидный состав определяли в условиях роста организма в присутствии отдельных жирных кислот и при разных температурах [1219] или в присутствии таких агентов, как спирты и детергенты [1582]. В этих случаях объяснить адаптивную реакцию только с помощью вязкостных свойств не удастся, поскольку необходимо учитывать равновесие между ламеллярной и неламеллярной фазами. Вообще говоря, анализ можно проводить, основываясь на величине параметра упаковки липидов, поскольку от него зависит фазовое состояние смеси мембранных липидов (гл. 3). Механизмы, с помощью которых организм адаптируется к изменяющимся условиям окружающей среды путем изменения своего липидного состава, неизвестны.

10.6. Резюме

Клетки эукариот содержат много мембранных органелл и множество различных внутриклеточных мембран, каждая из которых обладает уникальным белковым и липидным составом. Любой мембранный белок, информация о синтезе которого заключена в ядре, должен безошибочно доставляться от места синтеза на рибосоме, находящейся в цитоплазме, к месту назначения. Для этого используется сложная система сигнальных последовательностей, содержащихся в любой зрелой форме полипептида или предшественника, а также рецепторы внутри клетки, способные эти сигналы распознавать. Некоторые мембранные белки включаются в липидный бислой самопроизвольно, но в большинстве случаев правильная сборка белка внутри клеточной мембраны является энергозависимым процессом, который осуществляется с помощью специализированного аппарата. По-видимому, белки не могут включиться в клеточную мембрану до тех пор, пока они не приобретут частично развернутую конформацию. Разворачивание белков или поддержание их в развернутой конформации, необходимой для переноса, возможно, осуществляются при участии АТФ и специфических белков в цитоплазме.

В эукариотической клетке большинство липидов синтезируется в

эндоплазматическом ретикулуме, и чтобы попасть к месту назначения, они должны пройти через соответствующие мембраны. Механизм транспорта липидов неизвестен, можно лишь предположить, что в нем участвуют везикулы и белки, связывающие липиды. Способ поддержания липидного состава различных внутриклеточных мембран тоже не установлен.

Приложение

ОДНО- И ТРЕХБУКВЕННЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислота	Трехбуквенное обозначение	Однобуквенное обозначение
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asp	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Glu	E
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Цистеин	Cys	C
Фенилаланин	Phe	F

1. *Abeywardena M. Y., Charnock J. S.* (1983). Modulation of Cardiac Glycoside Inhibition of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ by Membrane Lipids: Differences between Species, *Biochim. Biophys. Acta*, **729**, 75—84.
2. *Adams G. A., Rose J. K.* (1985). Structural Requirements of a Membrane-Spanning Domain for Protein Anchoring and Cell Surface Transport, *Cell*, **41**, 1007—1015.
3. *Addison R.* (1986). Primary Structure of the *Neurospora* Plasma Membrane H^+ -ATPase Deduced from the Gene Sequence: Homology to Na^+/K^+ , Ca^{2+} , and K^+ -ATPases, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14896—14901.
4. *Adrian G. S., McCammon M. T., Montgomery D. L., Douglas M. G.* (1986). Sequences Required for Delivery and Localization of The ADP/ATP Translocator to the Mitochondrial Inner Membrane, *Mol. Cell Biol.*, **6**, 626—634.
5. *Agard D. A., Stroud R. M.* (1981). Linking Regions Between Helices in Bacteriorhodopsin Revealed, *Biophys. J.*, **37**, 589—602.
6. *Aggeler R., Zhang Y.-Z., Capaldi R. A.* (1987). Labeling of the ATP Synthase of *Escherichia coli* from the Head-Group Region of the Lipid Bilayer, *Biochemistry*, **26**, 7107—7113.
7. *Aiyer R. A.* (1983). Structural Characterization of Insulin Receptors: I. Hydrodynamic Properties of Receptors from Turkey Erythrocytes, *J. Bio. Chem.*, **258**, 14 992—14 999.
8. *Aizawa S., Tavassoli M.* (1987). In Vitro Homing of Hemopoietic Stem Cells Is Mediated by a Recognition System with Galactosyl and Mannosyl Specificities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4485—4489.
9. *Akabas M. H., Cohen F. S., Finkelstein A.* (1984). Separation of the Osmotically Driven Fusion Event from Vesicle-Planar Membrane Attachment in a Model System for Exocytosis, *J. Cell. Biol.*, **98**, 1063—1071.
10. *Akiyama Y., Ito K.* (1986). Overproduction, Isolation and Determination of the Amino-terminal Sequence of the Sec Y Protein, a Membrane Protein Involved in Protein Export in *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.*, **159**, 263—266.
11. *Akiyama Y., Ito K.* (1987). Topology Analysis of the Sec Y Protein, an Integral Membrane Protein Involved in Protein Export in *Escherichia coli*, *The EMBO Journal*, **6**, 3465—3470.
12. *Akutsu H., Suezaki Y., Yoshikawa W., Kyogoku Y.* (1986). Influence of Metal Ions and a Local Anesthetic on the Conformation of the Choline Group of Phosphatidylcholine Bilayers Studied by Raman Spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **854**, 213—218.
13. *Albert A. D., Lane S. A., Yeagle P. L.* (1985). ^2H and ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Studies of Membranes Containing Bovine Rhodopsin, *J. Membrane Biol.*, **87**, 211—215.
14. *Albertsson P.-A.* (1974). Countercurrent Distribution of Cells and Cell Organelles, *Methods in Enz.*, **31**, 761—769.
15. *Albertsson P.-A.* (1979). Phase Partition of Cells and Subcellular Particles. Separation of Cells and Subcellular Elements (H. Peeters, Ed.), pp. 17—22, Pergamon Press, New York.
16. *Albon N., Sturtevant J. M.* (1978). Nature of the Gel to Lipid Crystal Transition of Synthetic Phosphatidylcholines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2258—2260.
17. *Allen J. P., Feher G., Yeates T. O., Komiya H., Rees D. C.* (1987). Structure of the Reaction Center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: The Cofactors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5730—5734.
18. *Allen J. P., Feher G., Yeates T. O., Rees D. C., Deisenhofer J., Michel H., Huber R.* (1986). Structural Homology of Reaction Centers from *Rhodopseudomonas sphaeroides* and *Rhodopseudomonas viridis* as Determined by X-Ray Diffraction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8589—8693.
19. *Allen J. P., Feher G.* (1984). Crystallization of Reaction Center from *Rhodopseudomonas sphaeroides*: Preliminary Characterization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4795—4799.
20. *Allen T. M., Romans A. Y., Kercret H., Segrest J. P.* (1980). Detergent Removal During Membrane Reconstitution, *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 328—342.
21. *Allison D. S., Schatz G.* (1986). Artificial Mitochondrial Presequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9011—9015.
22. *Allured V. S., Collier R. J., Carroll S. F., McKay D. B.* (1986). Structure of Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom Resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1320—1324.
23. *Almog S., Kushnir T., Nir S., Lichtenberg D.* (1986). Kinetic and Structural Aspects of Reconstitution of Phosphatidylcholine Vesicles by Dilution of Phosphatidylcholine-Sodium Cholate Mixed Micelles, *Biochemistry*, **25**, 2597—2605.
24. *Alonso A., Restall C. J., Turner M., Gomez-Fernandez J. C., Goni F. M., Chapman D.* (1982). Protein-Lipid Interactions and Differential Scanning Calorimetric Studies of Bacteriorhodopsin Reconstituted Lipid-Water System, *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 283—289.
25. *Alpes H., Allman K., Plattner H., Reichert J., Riek R., Schulz S.* (1986). Formation of Large Unilamellar Vesicles Using Alkyl Maltoside Detergents, *Biochim. Biophys. Acta*, **862**, 294—302.
26. *Altenbach C., Seelig J.* (1985). Binding of the Lipophilic Cation Tetraphenylphosphonium to Phosphatidylcholine Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **818**, 410—415.
27. *Altenbach C., Seelig J.* (1984). Ca^{2+} Binding to Phosphatidylcholine Bilayers As Studied by Deuterium Magnetic Resonance. Evidence for the Formation of a Ca^{2+} Complex with Two Phospholipid Molecules, *Biochemistry*, **23**, 3913—3920.
28. *Alvarez J., Lee D. C., Baldwin S. A., Chapman D.* (1987). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study of the Structure and Conformational Changes of the Human Erythrocyte Glucose Transporter, *J. Biol. Chem.*, **262**, 3502—3509.
29. *Ameloot M., Hendrickx H., Herremans W., Pottel H., Van Cauwelaert F., Van Der Meer W.* (1984). Effect of Orientational Order on the Decay of the Fluorescence Anisotropy in Membrane Suspensions, *Biophys. J.*, **46**, 526—539.
30. *Ames G. F.-L.* (1986). The Basis of Multidrug Resistance in Mammalian Cells: Homology with Bacterial Transport, *Cell*, **47**, 323—324.
31. *Ames G. Ferro-Luzzi* (1986). Bacterial Periplasmic Transport Systems: Structure, Mechanism, and Evolution, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 397—425.

32. *Amey R. L., Chapman D.* (1984). Infrared Spectroscopic Studies of Model and Natural Biomembranes. Biomembrane Structure and Function (D. Chapman, Ed.), pp. 199—256, Verlag Chemie, Basel.
33. *Anantharamaiah G. M., Jones J. L., Brouillette C. G., Schmidt C. F., Chung B. H., Hughes T. A., Bhowm A. S., Segrest J. P.* (1985). Studies of Synthetic Peptide Analogs of the Amphipathic Helix: Structures of Complexes with Dimyristoyl Phosphatidylcholine, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10 248—10 255.
34. *Anderle G., Mendelsohn R.* (1986). Fourier-Transform Infrared Studies of Ca ATPase/Phospholipid Interaction: Survey of Lipid Classes, *Biochemistry*, **25**, 2174—2179.
35. *Andersen J. P., Vilsen B., Collins J. H., Jorgensen P. L.* (1986). Localization of E1-E2 Conformational Transitions of Sarcoplasmic Reticulum Ca-ATPase by Tryptic Cleavage and Hydrophobic Labeling, *J. Membrane Biol.*, **93**, 85—92.
36. *Anderson R. A., Lovrien R. E.* (1984). Glycophorin Is Linked by Band 4.1 Protein to the Human Erythrocyte Membrane Skeleton, *Nature*, **307**, 655—658.
37. *Anderson R. A., Marchesi V. T.* (1985). Regulation of the Association of Membrane Skeletal Protein 4.1 with Glycophorin by a Polyphosphoinositide, *Nature*, **318**, 295—298.
38. *Anderson K., Hjorth R.* (1985). Isopycnic Centrifugation of Rat-Liver Microsomes in Iso-Osmotic Gradients of Percoll and Release of Microsomal Material by Low Concentrations of Sodium Deoxycholate, *Biochim. Biophys. Acta*, **770**, 97—100.
39. *Anner B. M.* (1985). Interaction of (Na⁺ + K⁺)-ATPase with Artificial Membranes. I. Formation and Structure of (Na⁺ + K⁺)-ATPase-Liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 319—334.
40. *Anraku Y., Gennis R. B.* (1987). The Aerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli*, *TIBS*, **12**, 262—266.
41. *Apell H.-J., Lauger P.* (1987). Quantitative Analysis of Pump-mediated Fluxes in Reconstituted Lipid Vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **861**, 302—310.
42. *Appleman J. R., Lienhard G. E.* (1985). Rapid Kinetics of the Glucose Transporter from Human Erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, **260**, 4575—4578.
43. *Applebury M. L.* (1987). Biochemical Puzzles about the Cyclic-GMP-dependent Channel, *Nature*, **326**, 546—547.
44. *Applebury M. L., Hargrave P. A.* (1986). Molecular Biology of the Visual Pigments, *Vision Res.*, **26**, 1881—1895.
45. *Aquila H., Link T. A., Klingenberg M.* (1987). Solute Carriers Involved in Energy Transfer of Mitochondria Form a Homologous Protein Family, *FEBS Lett.*, **212**, 1—9.
46. *Aquila H., Link T. A., Klingenberg M.* (1985). The Uncoupling Protein from Brown Fat Mitochondria Is Related to the Mitochondrial ADP/ATP Carrier. Analysis of Sequence Homologies and of Folding of the Protein in the Membrane, *The ENBO Journal*, **4**, 2369—2376.
47. *Agros P., Rao J.M.K., Hargrave P. A.* (1982). Structural Prediction of Membranebound Proteins, *Eur. J. Biochem.*, **128**, 565—575.
48. *Arinc E., Rzepecki L. M., Strittmatter P.* (1987). Topography of the C Terminus of Cytochrome b₅ Tightly Bound to Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **262**, 15 563—15 567.
49. *Aris J. P., Simoni R. D.* (1983). Crosslinking and Labeling of the *Escherichia coli* F₁F₀-ATP Synthase Reveal a Compact Hydrophilic Portion of F₀ Close to an F₁ Catalytic Subunit, *J. Biol. Chem.*, **258**, 14 599—14 609.
50. *Ashendel C. L.* (1985). The Phorbol Ester Receptor: A Phospholipid-Regulated Protein Kinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 219—242.
51. *Audinger Y., Friedlander M., Blobel G.* (1987). Multiple Topogenic Sequences in Bovine Opsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5783—5387.
52. *Avers C. J., Szabo A., Price C.A.* (1969). Size-Separation of Yeast Mitochondria in the Zonal Centrifuge, *J. Bacteriology*, **100**, 1044—1048.
53. *Aveyard R., Haydon D. A.* (1973). An Introduction to the Principles of Surface Chemistry, Cambridge University Press, Cambridge.
54. *Azzone G. F., Pietrobon D., Zoratti M.* (1984). Determination of the Proton Electrochemical Gradient across Biological Membranes. Current Topics in Bioenergetics (C. P. Lee, Ed), Vol. **13**, pp. 1—77, Academic Press, Inc., New York.
55. *Bacallao R., Crooke E., Shiba K., Wickner W., Ito K.* (1986). The SecY Protein Can Act Post-translationally to Promote Bacterial Protein Export, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12 907—12 910.
56. *Bach D.* (1984). Calorimetric Studies of Model and Natural Biomembranes. Biomembrane Structure and Function. (D. Chapman, Ed.), pp. 1—41, Verlag Chemie, Basel.
57. *Baines A. J., Bennett V.* (1985). Synapsin I is a Spectrin-Binding Protein Immunologically Related to Erythrocyte Protein 4.1, *Nature*, **315**, 410—413.
58. *Baines A. J., Rennett V.* (1986). Synapsin I is a Microtubule-Bundling Protein, *Nature*, **319**, 145—147.
59. *Baker A., Schatz G.* (1987). Sequences from a Prokaryotic Genome or the Mouse Dihydrofolate Reductase Gene Can Restore the Import of a Truncated Precursor Protein into Yeast Mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3117—3121.
60. *Balch W. E., Keller D. S.* (1986). ATP-coupled Transport of Vesicular Stomatitis Virus G Protein between the Endoplasmic Reticulum and the Golgi, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14 690—14 696.
61. *Balch W. E., Dunphy W. C., Braell W. A., Rothman J. E.* (1984). Reconstitution of the Transport of Protein between Successive Compartments of the Golgi Measured by the Coupled Incorporation of N-Acetylglucosamine, *Cell*, **39**, 405—416.
62. *Bankaitis V. A., Bassford P. J.* (1984). The Synthesis of Export-defective Proteins Can Interfere with Normal Protein Export in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **259**, 12 193—12 200.
63. *Bar L. K., Barenholz Y., Thompson T. E.* (1987). Dependence of Phospholipid Composition of the Fraction of Cholesterol Undergoing Spontaneous Exchange between Small Unilamellar Vesicles, *Biochemistry*, **26**, 5460—5465.
64. *Bar R. S., Deamer D. W., Cornwell D. G.* (1966). Surface Area of Human Erythrocyte Lipids: Reinvestigation of Experiments on Plasma Membrane, *Science*, **153**, 1010—1012.
65. *Baranes D., Liu F. T., Razin E.* (1986). Thrombin and IgE Antigen Induce Formation of Inositol Phosphates by Mouse E-mast Cells, *FEBS Lett.*, **206**, 64—68.
66. *Barbas J. A., Vazquez D., Rodriguez-Tebar A.* (1985). Final Steps of the Maturation of Omp F, a Major Protein from the Outer Membrane of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **188**, 73—76.
67. *Barbas J. A., Diaz J., Rodriguez-Tebar A., Vazquez D.* (1986). Specific Location of Penicillin-Binding Proteins within the Cell Envelope of *Escherichia coli*, *J. Bacteriology*, **165**, 269—275.
68. *Barber J.* (1980). Membrane Surface Charges and Potentials in Relation to Photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **594**, 253—308.
69. *Barber J.* (1987). Photosynthetic Reaction Centres: A Common Link, *TIBS*, **12**, 321—326.
70. *Barchi R. L.* (1984). Voltage-sensitive Na⁺ Ion Channels: Molecular Properties and Functional Reconstitution, *TIBS*, **9**, 358—361.
71. *Barkas T., Mauron A., Roth B., Alliod C., Tzartos S. J., Ballivet M.* (1987). Mapping the Main Immunogenic Region and Toxin-Binding Site of the Nicotinic Acetylcholine Receptor, *Science*, **235**, 77—80.

72. Bartles J. R., Feracci H. M., Stieger B., Hubbard A. L. (1987). Biogenesis of the Rat Hepatocyte Plasma Membrane In Vivo: Comparison of the Pathways Taken by Apical and Basolateral Proteins Using Subcellular Fractionation, *J. Cell Biol.*, **105**, 1241—1251.
73. Barton P. G., Gunstone F. D. (1975). Hydrocarbon Chain Packing and Molecular Motion in Phospholipid Bilayers Formed from Unsaturated Lecithins, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4470—4476.
74. Batenburg A. M., Bougis P. E., Rochat H., Verkleij A. J., de Kruijff B. (1985). Penetration of a Cardiotoxin into Cardiolipin Model Membranes and Its Implications on Lipid Organization, *Biochemistry*, **24**, 7101—7110.
75. Baty D., Knibiehler M., Verheij H., Pattus F., Shire D., Bernadac A., Lazdunski C. (1987). Site-directed Mutagenesis of the COOH-terminal Region of Colicin A: Effect of Secretion and Voltage-dependent Channel Activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1152—1156.
76. Bazzi M. D., Nelsestuen G. L. (1987). Role of Substrate in Determining the Phospholipid Specificity of Protein Kinase C Activation, *Biochemistry*, **26**, 5002—5008.
77. Beals C. R., Wilson C. B., Perlmutter R. M. (1987). A Small Multigene Family Encodes G_i Signal-Transduction Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7886—7890.
78. Beavis A. D. (1987). Upper and Lower Limits of the Charge Translocations Stoichiometry of Cytochrome c Oxidase, *J. Biol. Chem.*, **262**, 6174—6181.
79. Begenisch T. (1987). Molecular Properties of Ion Permeation Through Sodium Channels, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **16**, 247—263.
80. Bell R. M. (1986). Protein Kinase C Activation by Diacylglycerol Second Messengers, *Cell*, **45**, 631—632.
81. Benga G., Popescu O., Pop V. I. (1986). P-(Chloromercuri)-benzenesulfonate Binding by Membrane Proteins and the Inhibition of Water Transport in Human Erythrocytes, *Biochemistry*, **25**, 1535—1538.
82. Bennett V. (1985). The Membrane Skeleton of Human Erythrocytes and Its Implications for More Complex Cells, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 273—304.
83. Benson S. A., Hall M. H., Rasmussen B. A. (1987). Signal Sequence Mutations That Alter Coupling of Secretion and Translation of an *Escherichia coli* Outer Membrane Protein, *J. Bacteriology*, **169**, 4686—4691.
84. Benson S. A., Hall M. N., Silhavy T. J. (1985). Genetic Analysis of Protein Transport in *Escherichia coli* K12, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 101—134.
85. Benson S. A., Bremer E., Silhavy T. J. (1984). Intragenic Regions Required for Lamb Export, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3830—3834.
86. Benz R. (1986). Porin from Bacterial and Mitochondrial Outer Membranes, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **19**, 145—185.
87. Benz R., Schmid A., Nakae T., Vos-Scheperkeuter G. H. (1986). Pore Formation by Lamb of *Escherichia coli* in Lipid Bilayer Membranes, *J. Bacteriology*, **165**, 978—986.
88. Benz R., Schmidt A., Wiedmer T., Sims P. J. (1986). Single-Channel Analysis of the Conductance Fluctuations Induced in Lipid Bilayer Membranes by Complement Proteins C5b-9, *J. Membrane Biol.*, **94**, 37—45.
89. Bergmann W. L., Dressler V., Haest C. W. M., Deuticke B. (1984). Reorientation Rates and Asymmetry of Distribution of Lysophospholipids Between the Inner and Outer Leaflet of the Erythrocyte Membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **772**, 328—336.
90. Berkhout T. A., Rietveld A., de Kruijff B. (1987). Preferential Lipid Association and Mode of Penetration of Apocytochrome c in Mixed Model Membranes as Monitored by Tryptophanyl Fluorescence Quenching Using Brominated Phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **897**, 1—4.
91. Berliner L. J., Koga K. (1987). α -Lactalbumin Binding to Membranes: Evidence for a Partially Buried Protein, *Biochemistry*, **26**, 3006—3009.
92. Bernheimer A. W., Rudy B. (1986). Interactions between Membranes and Cytolytic Peptides, *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 123—141.
93. Bernier-Valentin F., Aunis D., Rousset B. (1983). Evidence of Tubulin-binding Sites on Cellular Membranes: Plasma Membranes, Mitochondrial Membranes and Secretory Granule Membranes, *J. Cell. Biol.*, **97**, 209—216.
94. Berridge M. J. (1987). Inositol Triphosphate and Diacylglycerol: Two Interacting Second Messengers, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 159—193.
95. Besterman J. M., Pollenz R. S., Booker E. L., Cuatrecasas P. (1986). Diacylglycerol-induced Translocation of Diacylglycerol Kinase: Use of Affinity-purified Enzyme in a Reconstitution System, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9378—9382.
96. Beth A. H., Conturo T. E., Venkataramu S. D., Staros J. V. (1986). Dynamics and Interactions of the Anion Channel in Intact Human Erythrocytes: An Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopic Study Employing a New Membrane-Impermeant Bifunctional Spin-Label, *Biochemistry*, **25**, 3824—3832.
97. Bigay J., Deterre P., Pfister C., Chabre M. (1987). Fluoride Complexes of Aluminium or Beryllium Act on G-Proteins as Reversibly Bound Analogues of the gamma Phosphate of GTP, *The EMBO Journal*, **6**, 2907—2913.
98. Bigelow D. J., Tomas D. D. (1987). Rotational Dynamics of Lipid and the Ca-ATPase in Sarcoplasmic Reticulum, *J. Biol. Chem.*, **262**, 13 449—13 456.
99. Birchmeier W. (1984). Cytoskeleton Structure and Function, *TIBS*, **9**, 192—195.
100. Birnbaum M. J., Haspel H. C., Rosen O. M. (1986). Cloning and Characterization of a cDNA Encoding the Rat Brain Glucose-transporter Protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5784—5788.
101. Bishop J. M. (1985). Viral Oncogenes, *Cell*, **42**, 2338.
102. Bishop J. M. (1987). The Molecular Genetics of Cancer, *Science*, **235**, 305—311.
103. Bishop W. R., Bell R. M. (1985). Assembly of the Endoplasmic Reticulum Phospholipid Bilayer: The Phosphatidylcholine Transporter, *Cell*, **42**, 51—60.
104. Bjorkman P. J., Saper M. A., Samraoui B., Bennett W. S., Strominger J. L., Wiley C. D. (1987). The Foreign Antigen Binding Site and T Cell Recognition Regions of Class I Histocompatibility Antigens, *Nature*, **329**, 512—518.
105. Blair D. F., Gelles J., Chan S. I. (1986). Redox-linked Proton Translocation in Cytochrome Oxidase: The Importance of Gating Electron Flow: The Effects of Slip in a Model Transducer? *Biophys. J.*, **50**, 713—733.
106. Blake R., Hager L. P., Gennis R. B. (1978). Activation of Pyruvate Oxidase by Monomeric and Micellar Amphiphiles, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1963—1971.
107. Blanc J. P., Kaiser E. T. (1984). Biological and Physical Properties of a beta-Endorphin Analog Containing Only D-Amino Acids in the Amphiphilic Helical Segment 13—31, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9549—9556.
108. Blaurock A. E., Wilkins M. H. F. (1969). Structure of Frog Protoreceptor Membranes, *Nature*, **223**, 906—909.
109. Blaurock A. F., Worthington C. R. (1966). Treatment of Low Angle X-ray Data from Planar and Concentric Multilayer Structures, *Biophys. J.*, **6**, 305—312.
110. Bloch R. H., Froehner S. C. (1987). The Relationship of the Postsynaptic ^{43}K Protein to Acetylcholine Receptors in Receptor Clusters Isolated from Cultured Rat Myotubes, *J. Cell. Biol.*, **104**, 645—654.
111. Blocher D., Six L., Gutermann R., Henkel B., Ring K. (1985). Physicochemical Characterization of Tetraether Lipids from *Thermoplasma acidophilum*. Calorimetric

- Studies on Miscibility with Diether Model Lipids Carrying Branched or Unbranched Alkyl Chains, *Biochim. Biophys. Acta*, **818**, 333—342.
112. Blume A. (1983). Apparent Molar Heat Capacities of Phospholipids in Aqueous Dispersion. Effects of Chain Length and Head Group Structure, *Biochemistry*, **22**, 5436—5442.
 113. Boekema E. J., Van Heel M. G., Van Bruggen E. F. J. (1984). Three-dimensional Structure of Bovine NADH: Ubiquinone Oxidoreductase of the Mitochondrial Respiratory Chain, *Biochim. Biophys. Acta*, **787**, 19—26.
 114. Bogaert T., Brown N., Wilcox M. (1987). The Drosophila PS2 Antigen Is an Invertebrate Integrin That, Like the Fibronectin Receptor, Becomes Localized to Muscle Attachments, *Cell*, **51**, 929—940.
 115. Boggs J. M. (1987). Lipid Intermolecular Hydrogen Bonding: Influence on Structural Organization and Membrane Function, *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 353—404.
 116. Boggs J. M. (1983). The Hydrophobic and Electrostatic Effects of Proteins on Lipid Fluidity and Organization. Membrane Fluidity in Biology (R. C. Aloia, Ed.), Vol. 2, pp. 89—130, Academic Press, New York.
 117. Bohnenberger E., Sandermann H. (1983). Lipid Dependence of Diacylglycerol Kinase from *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* **132**, 645—650.
 118. Bolard J. (1986). How Do the Polyene Macrolide Antibiotics Affect the Cellular Membrane Properties? *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 257—304.
 119. Bon J., Lebrun E., Gornel J., VanRapebusch R., Cartaud J., Popot J.-L., Changeux J.-P. (1984). Image Analysis of the Heavy Form of the Acetylcholine Receptor from *Torpedo marmorata*, *J. Mol. Biol.*, **176**, 205—237.
 120. Boni-Schnetzler M., Pilch P. F. (1987). Mechanism of Epidermal Growth Factor Receptor Autophosphorylation and High-Affinity Binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7832—7836.
 121. Bonner T. I., Buckley N. J., Young A. C., Brann M. R. (1987). Identification of a Family of Muscarinic Acetylcholine Receptor Genes, *Science*, **237**, 527—532.
 122. Borle F., Seelig J. (1985). Ca^{2+} Binding to Prostatidylglycerol Bilayers as Studied by Differential Scanning Calorimetry and ^2H - and ^{31}P -Nuclear Magnetic Resonance, *Chem. Phys. Lipids*, **36**, 263—283.
 123. Borle F., Seelig J. (1983). Hydration of *Escherichia coli* Lipids: Deuterium T₁ Relaxation Time Studies of Phosphatidylglycerol, Prostatidylethanolamine and Phosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta*, **735**, 131—136.
 124. Borts P. (1986). How Proteins Get into Microbodies (Peroxisomes, Glyoxysomes, Glycosomes), *Biochim. Biophys. Acta*, **866**, 179—203.
 125. Bosterling B., Thudell J. R. (1982). Association of Cytochrome b₅ and Cytochrome P-450 Reductase with Cytochrome P-450 in the Membrane of Reconstituted Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **257**, 4783—4787.
 126. Bouillon P., Drischel C., Vergnolle C., Duranton H., Kader J.-C. (1987). The Primary Structure of Spinach-leaf Phospholipid-transfer Protein, *Eur. J. Biochem.*, **166**, 387—391.
 127. Boulain J. C., Charbit A., Hofnung M. (1986). Mutagenesis by Random Linker Insertion into the lamB Gene of *Escherichia coli* K₁₂, *Mol. Gen. Genet.*, **205**, 339—348.
 128. Bowman B. J., Bowman E. J. (1986). H^+ -ATPase from Mitochondria, Plasma Membranes, and Vacuoles of Fungal Cells, *J. Membrane Biol.*, **94**, 83—97.
 129. Boyd D., Manoil C., Beckwith J. (1987). Determinants of Membrane Protein Topology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8525—8529.
 130. Braell W. A. (1987). Fusion between Endocytic Vesicles in a Cell-Free System., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1137—1141.
 131. Bramhall J. (1986). Use of the Fluorescent Weak Acid Dancylglycine to Measure Transmembrane Proton Concentration Gradients, *Biochemistry*, **25**, 3958—3962.
 132. Bramley H. F., Kornberg H. L. (1987). Sequence Homologies between Proteins of Bacterial Phosphoenolpyruvate-dependent Sugar Phosphotransferase Systems: Identification of Possible Phosphate-carrying Histidine Residues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4777—4780.
 133. Brandl C. J., Deber C. M. (1986). Hypothesis about the Function of Membrane-buried Proline Residues in Transport Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 917—921.
 134. Brandl C. J., Green N. M., Korczak B., MacLennan D. H. (1986). Two Ca^{2+} ATPase Genes: Homologies and Mechanistic Implications of Deduced Amino Acid Sequences, *Cell*, **44**, 597—607.
 135. Branton D. (1966). Fracture Faces of Frozen Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 1048—1056.
 136. Branton D. (1971). Freeze-etching Studies of Membrane Structure, *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, **B**, **261**, 133—138.
 137. Brasseur R., de Killian J. A., Kruijff B., Ruysschaert J. M. (1987). Conformational Analysis of Gramacidin-Gramacidin Interactions at the Air/Water Interface Suggests that Gramacidin Aggregates into Tube-like Structures Similar as Found in the Gramacidin-induced Hexagonal H_{II} Phase, *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 11—17.
 138. Brasseur R., Ruysschaert J. M. (1986). Conformation and Mode of Organization of Amphiphilic Membrane Components: A Conformational Analysis, *Biochem. J.*, **238**, 1—11.
 139. Braulke T., Gartung C., Hasilik A., von Figura K. (1987). Is Movement of Mannose 6-Phosphate-specific Receptor Triggered by Binding of Lysosomal Enzymes? *J. Cell Biol.*, **104**, 1735—1742.
 140. Brauner T., Hulser D. F., Strasser R. J. (1984). Comparative Measurements of Membrane Potentials with Microelectrodes and Voltage-sensitive Dyes, *Biochim. Biophys. Acta*, **771**, 208—216.
 141. Brecher P., Saouaf R., Sugarman J. M., Eisenberg D., LaRosa K. (1984). Fatty Acid Transfer between Multilamellar Liposomes and Fatty Acid-binding Protein, *J. Biol. Chem.*, **259**, 13 395—13 401.
 142. Breitmeyer J. B. (1987). How T Cells Communicate, *Nature*, **329**, 760—761.
 143. Bremer E. G., Schlessinger J., Hakomori S. (1986). Ganglioside-mediated Modulation of Cell Growth: Specific Effects of GM₃ on Tyrosine Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor, *J. Biol. Chem.*, **261**, 2434—2440.
 144. Brent L. G., Srere P. A. (1984). The Interaction of Yeast Citrate Synthase with Yeast Mitochondrial Inner Membranes, *J. Biol. Chem.*, **262**, 319—325.
 145. Bretscher M. S. (1972). Phosphatidylethanolamine: Differential Labelling in Intact Cells and Ghosts of Human Erythrocytes by a Membrane-impermeable Reagent, *J. Mol. Biol.*, **71**, 523—528.
 146. Bretscher M. S. (1984). Endocytosis: Relation to Capping and Cell Locomotion, *Science*, **224**, 681—686.
 147. Briggs M. S., Cornell D. C., Dluhy R. A., Gierasch L. M. (1986). Conformations of Signal Peptides Induced by Lipids Suggest Initial Steps in Protein Export, *Science*, **233**, 206—208.
 148. Briggs M. S., Gierasch L. M., Zlotnick A., Lear J. D., DeGrado W. F. (1985). In Vivo Function and Membrane Binding Properties Are Correlated for *Escherichia coli* LamB Signal Peptides, *Science*, **228**, 1096—1099.
 149. Brisson A., Unwin R. N. T. (1985). Quarternary Structure of the Acetylcholine Receptor, *Nature*, **315**, 474—477.

150. *Brooker R. J., Fiebig K., Wilson T. H.* (1985). Characterization of Lactose Carrier Mutants Which Transport Maltose, *J. Biol. Chem.*, **260**, 16 181—16 186.
151. *Brothers J. R., Griffith O. H., Brothers M. O., Jost P. C., Silvius J. R., Hokin L. E.* (1981). Lipid-Protein Multiple Binding Equilibria in Membranes, *Biochemistry*, **20**, 5261—5267.
152. *Brown M. S., Goldstein J. L.* (1986). A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis, *Science*, **232**, 34—47.
153. *Brown R. E., Thompson T. E.* (1987). Spontaneous Transfer of Ganglioside GM₁ Between Phospholipid Vesicles, *Biochemistry*, **26**, 5454—5460.
154. *Bruckdorfer N. R., Sherry M. K.* (1984). The Solubility of Cholesterol and Its Exchange Between Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 187—196.
155. *Brugge J. S.* (1986). The p35/p36 Substrates of Protein-Tyrosine Kinases as Inhibitors of Phospholipase A₂, *Cell*, **46**, 149—150.
156. *Brunner J., Franzusoff A. J., Luscher B., Zugliani C., Semenza G.* (1985). Membrane Protein Topology: Amino Acid Residues in a Putative Transmembrane Alpha-Helix of Bacteriorhodopsin Labeled with the Hydrophobic Carbene-Generating Reagent 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-[¹²⁵I]iodophenyl)diazirine, *Biochemistry*, **24**, 5422—5430.
157. *Brunner J., Franzusoff A. J., Luscher B., Zugliani C., Semenza G.* (1985). Membrane Protein Topology: Amino Acid Residues in a Putative Transmembrane alpha-Helix of Bacteriorhodopsin Labeled with the Hydrophobic Carbene-Generating Reagent 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-[¹²⁵I]iodophenyl)diazirine, *Biochemistry*, **24**, 5422—5430.
158. *Brunner J., Spiess M., Aggeler R., Huber P., Semenza G.* (1983). Hydrophobic Labeling of a Single Leaflet of the Human Erythrocyte Membrane, *Biochemistry*, **22**, 3812—3820.
159. *Buchel D. E., Gronenborn B., Muller-Hill B.* (1980). Sequence of the Lactose Permease Gene, *Nature*, **283**, 541—545.
160. *Buck C. A., Horwitz A. F.* (1987). Cell Surface Receptors for Extracellular Matrix Molecules, *Ann. Rev. Cell Biol.*, **3**, 179—205.
161. *Buldt G., Gally H. U., Seelig A., Seelig J., Zaccai G.* (1978). Neutron Diffraction Studies on Selectively Deuterated Phospholipid Bilayers, *Nature*, **271**, 182—184.
162. *Bullivant S.* (1974). Freeze-etching Techniques Applied to Biological Membranes, *Phil. Trans. Roy. Soc. London, B*, **268**, 5—14.
163. *Burch R. M., Luini A., Axelrod J.* (1986). Phospholipase A₂ and Phospholipase C Are Activated by Distinct GTP-Binding Proteins in Response to α_1 -Adrenergic Stimulation in FRTL5 Thyroid Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7201—7205.
164. *Burdette R. A., Quinn D. M.* (1986). Interfacial Reaction Dynamics and Acylenzyme Mechanism for Lipoprotein Lipase-catalysed Hydrolysis of Lipid p-Nitrophenyl Esters, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12 016—12 021.
165. *Burgess T. L., Craik C. S., Matsuuchi L., Kelly R. B.* (1987). In Vitro Mutagenesis of Trypsinogen: Role of the Amino Terminus in Intracellular Protein Targeting to Secretory Granules, *J. Cell Biol.*, **105**, 659—668.
166. *Burgoyne R. D.* (1987). Phosphorylation of the Muscarinic Receptor, *TIBS*, **12**, 208—209.
167. *Burgoyne R. D.* (1987). Control of Exocytosis, *Nature*, **328**, 112—113.
168. *Burke B., Matlin K., Bause E., Legler G., Peyrieras N., Ploegh H.* (1984). Inhibition of N-linked Oligosaccharide Trimming Does Not Interfere with Surface Expression of Central Integral Membrane Proteins, *The EMBO Journal*, **3**, 551—556.
169. *Burn P., Rotman A., Meyer R. K., Burger M. M.* (1985). Diacylglycerol in Large α -Actinin/Actin Complexes and in the Cytoskeleton of Activated Platelets, *Nature*, **314**, 469—472.
170. *Burnett B. K., Robson R. J., Takagaki Y., Radhakrishnan R., Khorana H. G.* (1985). Synthesis of Phospholipids Containing Photoactivatable Carbene Precursors in the Headgroups and Their Crosslinking with Membrane Proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **815**, 57—67.
171. *Bush S. F., Adams R. G., Levin I. M.* (1980). Structural Reorganization in Lipid Bilayer Systems: Effect of Hydration and Sterol Addition on Raman Spectra of Dipalmitoylphosphatidylcholine Multilayers, *Biochemistry*, **19**, 4429—4436.
172. *Buss J. E., Mumby S. M., Casey P. J., Gilman A. G., Sefton B. M.* (1987). Myristoylated α Subunits of Guanine Nucleotide-binding Regulatory Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7493—7497.
173. *Byers T. J., Branton D.* (1985). Visualization of the Protein Association in the Erythrocyte Membrane Skeleton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6153—6157.
174. *Caffrey M., Feigenson G. M.* (1981). Fluorescence Quenching in Model Membranes. 3. The Relationship Between Calcium Adenosine Triphosphatase Enzyme Activity and the Affinity of the Protein for Phosphatidylcholine with Different Acyl Chain Characteristics, *Biochemistry*, **20**, 1949—1961.
175. *Caffrey M., Feigenson G. M.* (1984). Influence of Metal Ions on the Phase Properties of Phosphatidic Acid in Combination with Natural and Synthetic Phosphatidylcholines: An X-ray Diffraction Study Using Synchrotron Radiation, *Biochemistry*, **23**, 323—331.
176. *Cafiso D. S., Hubbell W. L.* (1981). Investigation of Electrical Phenomena in Membranes: New Approaches with Spin Labelling, *Molecular Basis of Drug Action* (Singer and Ondarza, Eds.), pp. 254—269, Elsevier, New York.
177. *Cafiso D. S., Hubbell W. L.* (1978). Estimation of Transmembrane Potentials from Phase Equilibria of Hydrophobic Paramagnetic Ions, *Biochemistry*, **17**, 187—194.
178. *Cain B. D., Simoni R. O.* (1986). Impaired Proton Conductivity Resulting from Mutations in the α Subunit of F₁F₀ ATPase in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 10 043—10 050.
179. *Callender R., Honig B.* (1977). Resonance Raman Studies of Visual Pigments, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **6**, 33—55.
180. *Cameron D. G., Mantsch H. H.* (1978). The Phase Transition of 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerolphosphocholine as Seen by Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy, *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **83**, 886—892.
181. *Cameron D. G., Casal H. L., Mantsch H. H.* (1980). Characterization of the Pretransition in 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biochemistry*, **19**, 3665—3672.
182. *Campbell I. D., Dwek R. A.* (1984). *Biological Spectroscopy*, Benjamin/Cummings Publishing Co., Menlo Park, California.
183. *Cantor C. R., Schimmel P. R.* (1980). *Biophysical Chemistry*, W. H. Freeman and Co., San Francisco.
184. *Caras I. W., Weddell G. N., Davitz M. A., Nussenzweig V., Martin D. W.* (1987). Signal for Attachment of a Phospholipid Membrane Anchor in Decay Accelerating Factor, *Science*, **238**, 1280—1283.
185. *Cardoza J. D., Kleinfeld A. M., Stallcup K. C., Mescher M. F.* (1984). Hairpin Configuration of H-2K in Liposomes Formed by Detergent Dialysis, *Biochemistry*, **23**, 4401—4409.
186. *Carpenter D., Jackson T., Hanley M. R.* (1987). Coping with a Growing Family, *Nature*, **325**, 107—108.
187. *Carpenter C.* (1987). Receptors for Epidermal Growth Factor and Other Polypeptide Mitogens, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 881—914.

188. Carrier D., Pezolet M. (1986). Investigation of Polylysine-Dipalmitoylphosphatidylglycerol Interactions in Model Membranes, *Biochemistry*, **25**, 4167—4174.
189. Carruthers A., Melchior D. L. (1986). How Bilayer Lipids Affect Membrane Protein Activity, *TIBS*, **11**, 331—335.
190. Casal H. L., Mantsch H. H. (1984). Polymorphic Phase Behavior of Phospholipid Membranes Studied by Infrared Spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **779**, 381—401.
191. Casey R. P. (1984). Membrane Reconstitution of the Energy-Conserving Enzymes of Oxidative Phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 319—347.
192. Catron K. M., Schnaitman C. A. (1987). Export of Protein in *Escherichia coli*: a Novel Mutation in *ompC* Affects Expression of Other Major Outer Membrane Proteins, *J. Bacteriology*, **169**, 4327—4334.
193. Caterall W. A. (1986). Molecular Properties of Voltage-Sensitive Sodium Channels, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 953—985.
194. Cevc G. (1987). How Membrane Chain Melting Properties Are Regulated by the Polar Surface of the Lipid Bilayer, *Biochemistry*, **26**, 6305—6310.
195. Cevc G., March D. (1985). Hydration of Noncharged Lipid Bilayer Membranes: Theory and Experiments with Phosphatidylethanolamines *Biophys. J.*, **47**, 21—31.
196. Chabre M. (1987). The G Protein Connection: Is It in the Membrane or the Cytoplasm? *TIBS*, **12**, 213—215.
197. Chang Y.-Y., Cronan J. E. (1986). Molecular Cloning, DNA Sequencing and Enzymatic Analyses of Two *Escherichia coli* Pyruvate Oxidase Mutants Defective in Activation by Lipids, *J. Bacteriology*, **167**, 312—318.
198. Chapman D. (1982). Protein-Lipid Interaction in Model and Natural Biomembranes, *Biological Membranes* (D. Chapman, Ed.), Vol. **4**, pp. 179—229, Academic Press, New York.
199. Chapman D., Benga G. (1984). Biomembrane Fluidity—Studies of Model and Natural Biomembranes, *Biological Membranes* (D. Chapman, Ed.), Vol. **5**, pp. 1—56, Academic Press, New York.
200. Charbit A., Boulain J. C., Ryter A., Hofnung M. (1986). Probing the Topology of a Bacterial Membrane Protein by Genetic Insertion of a Foreign Epitope: Expression at the Cell Surface, *The EMBO Journal*, **5**, 3029—3037.
201. Cheifetz S., Boggs J. M., Moscarello M. A. (1985). Increase in Vesicle Permeability Mediated by Myelin Basic Protein: Effect of Phosphorylation of Basic Protein, *Biochemistry*, **24**, 5170—5175.
202. Chen C.-C., Kurokawa T., Shaw S.-Y., Tillotson L. G., Kalled S., Isselbacher K. J. (1986). Human Erythrocyte Glucose Transporter: Normal Asymmetric Orientation and Function in Liposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2652—2656.
203. Chen C.-M., Misra T. K., Silver S., Rosen B. R. (1986). Nucleotide Sequence of the Structural Genes for an Anion Pump: The Plasmid-Encoded Arsenical Resistance Operon, *J. Biol. Chem.*, **261**, 15 030—15 038.
204. Chen L., Tai P. C. (1986). Roles of H^+ -ATPase and Proton Motive Force in ATP-Dependent Protein Translocation In Vitro, *J. Bacteriology*, **167**, 389—392.
205. Chen L., Tai P. C., Briggs M. S., Gierasch L. M. (1978). Protein Translocation into *Escherichia coli* Membrane Vesicles Is Inhibited by Functional Synthetic Signal Peptides, *J. Biol. Chem.*, **262**, 1427—1429.
206. Chen W.-J., Douglas M. G. (1987). The Role of Protein Structure in the Mitochondrial Import Pathway, *J. Biol. Chem.*, **262**, 15 605—15 609.
207. Chen W.-J., Douglas M. G. (1987). Phosphodiester Bond Cleavage Outside Mitochondria Is Required for the Completion of Protein Import into the Mitochondrial Matrix, *Cell*, **49**, 651—658.
208. Cheneval D., Muller M., Toni R., Ruetz S., Carafoli E. (1985). Adriamycin as a Probe for the Transversal Distribution of Cardiolipin in the Inner Mitochondrial Membrane, *J. Biol. Chem.*, **260**, 13 003—13 007.
209. Cheng K.-H., Lepock J. R., Hui S. W., Yeagle P. L. (1986). The Role of Cholesterol in the Activity of Reconstituted Ca-ATPase Vesicles Containing Unsaturated Phosphatidylethanolamine, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5081—5087.
210. Cheresch D. A., Pytela R., Pierschbacher M. D., Klier F. G., Ruoslahti E., Reisfeld R. A. (1987). An Arg-Gly-Asp-directed Receptor on the Surface of Human Melanoma Cells Exists in a Divalent Cation-dependent Functional Complex with the Disialoganglioside GD₂, *J. Cell Biol.*, **105**, 1163—1173.
211. Cherry R. J. (1979). Rotational and Lateral Diffusion of Membrane Proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 289—327.
212. Cherry R. J., Muller U., Henderson R., Heyn M. P. (1978). Temperature-dependent Aggregation of Bacteriorhodopsin in Dipalmitoyl- and Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicles, *J. Mol. Biol.*, **121**, 283—298.
213. Chicken C. A., Sharom F. J. (1984). Lipid-Protein Interactions of the Human Erythrocyte Concanavalin. A Receptor in Phospholipid Bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **774**, 110—118.
214. Chung B. H., Anantharamaiah G. M., Brouillette C. G., Nishida T., Segrest J. P. (1985). Studies of Synthetic Peptide Analogs of the Amphipathic Helix: Correlation of Structure with Function, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10 256—10 262.
215. Chong P. L.-G., Weber G. (1983). Pressure Dependence of 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene Fluorescence in Single-component Phosphatidylcholine Liposomes, *Biochemistry*, **22**, 5544—5550.
216. Chong P. L.-G., Fortes P. A. G., Jameson D. M. (1985). Mechanisms of Inhibition of (Na, K)-ATPase by Hydrostatic Pressure Studied with Fluorescent Probes, *J. Biol. Chem.*, **260**, 14 484—14 490.
217. Chothia C. (1976). The Nature of the Accessible and Buried Surfaces in Proteins, *J. Mol. Biol.*, **105**, 1—14.
218. Chou P. U., Fasman G. D. (1974). Prediction of Protein Conformation, *Biochemistry*, **13**, 222—245.
219. Christiansen K., Carlsen J. (1985). Reconstitution of Cytochrome *b₅* into Lipid Vesicles in a Form Which Is Nonsusceptible to Attack Carboxypeptidase Y, *Biochim. Biophys. Acta*, **815**, 215—222.
220. Chung L., Kaloyanides G., McDaniel R., McLaughlin A., McLaughlin S. (1985). Interaction of Gentamicin and Spermine with Bilayer Membranes Containing Negatively Charged Phospholipids, *Biochemistry*, **24**, 442—452.
221. Clancy R. M., Wissenberg A. R., Glaser M. (1981). Use of Phospholipase D to Alter the Surface Charge of Membranes and Its Effect on the Enzymatic Activity of D-β-Hydroxybutyrate Dehydrogenase, *Biochemistry*, **20**, 6060—6065.
222. Clancy R. M., McPherson L. H., Glaser M. (1983). Effects of Change in the Phospholipid Composition on the Enzyme Activity of D-β-Hydroxybutyrate Dehydrogenase in Rat Hepatocytes, *Biochemistry*, **22**, 2358—2364.
223. Clarke S. (1975). The Size and Detergent Binding of Membrane Proteins, *J. Biol. Chem.*, **250**, 5459—5469.
224. Classen J., Heast C. W. M., Tournois H., Deuticke B. (1987). Gramacidin-Induced Enhancement of Transbilayer Reorientation of Lipids in the Erythrocyte Membrane, *Biochemistry*, **26**, 6604—6612.
225. Clejan S., Bittman R. (1985). Rates of Amphotericin B and Filipin Association with Sterols, *J. Biol. Chem.*, **260**, 2884—2889.

226. Clejan S., Bittman R. (1984). Distribution and Movement of Sterols with Different Side Chain Structure Between the Two Leaflets of the Membrane Bilayer of Mycoplasma Cells, *J. Biol. Chem.*, **259**, 449—455.
227. Clement J. M., Lepouce E., Marchal C., Hofnung M. (1983). Genetic study of a Membrane Protein: DNA Sequence Alterations due to 17 *lamb* Point Mutations Affecting Adsorption of Phage lambda, *The EMBO Journal*, **2**, 77—80.
228. Cockcroft S. (1987). Polyphosphoinositide Phosphodiesterase: Regulation by a Novel Guanine Nucleotide Binding Protein, *G_p*, *TIBS*, **12**, 75—78.
229. Caffrey M., Feigenson G. W. (1981). Fluorescence Quenching in Model Membranes. 3. Relationships Between Calcium Adenosine Triphosphatase Enzyme Activity and the Affinity of the Protein for Phosphatidylcholine with Different Acyl Chain Characteristics, *Biochemistry*, **20**, 1949—1961.
230. Cohen L. B., Salzberg B. M. (1978). Optical Measurement of Membrane Potential, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **83**, 35—88.
231. Cohn E. J., Edsall J. T. (1943). *Proteins, Amino Acids, and Peptides*, Reinhold, New York.
232. Cole G. J., Loewy A., Glaser L. (1986). Neuronal Cell-Cell Adhesion Depends on Interactions of N-CAN with Heparin-like Molecules, *Nature*, **320**, 445—447.
233. Cole G. J., Loewy A., Cross N. V., Akeson R., Glaser L. (1986). Topographic Localization of the Heparin-binding Domain of the Neural Cell Adhesion Molecule N-CAM, *J. Cell Biol.*, **103**, 1739—1744.
234. Coleman J., Inukai M., Inouye M. (1985). Dual Functions of the Signal Peptide in Protein Transfer Across the Membrane, *Cell*, **43**, 351—360.
235. Collarini M., Amblard G., Lazdunski C., Pattus F. (1987). Gating Processes of Channels Induced by Colicin A, Its C-terminal Fragment and Colicin E1 in Planar Lipid Bilayers, *Eur. Biophys. J.*, **14**, 147—153.
236. Collier B. S. (1986). Activation Affects Access to the Platelet Receptor for Adhesive Glycoproteins, *J. Cell Biol.*, **103**, 451—456.
237. Colman A., Robinson C. (1986). Protein Import into Organelles: Hierarchical Targeting Signals, *Cell*, **46**, 321—322.
238. Condon C., Cammack R., Patil D. S., Owen P. (1985). The Succinate Dehydrogenase of *Escherichia coli*: Immunochemical Resolution and Biophysical Characterization of a 4-Subunit Enzyme Complex, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9427—9434.
239. Connelly P. A., Sisk R. B., Schulman H., Garrison J. C. (1987). Evidence for the Activation of the Multifunctional Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase in Response to Hormones That Increase Intracellular Ca^{2+} , *J. Biol. Chem.*, **262**, 10 154—10 163.
240. Connolly T. J., Carruthers A., Melchior D. L. (1985). Effect of Bilayer Cholesterol Content of Reconstituted Human Erythrocyte Sugar Transporter Activity, *J. Biol. Chem.*, **260**, 2617—2620.
241. Cooper C. L., Vandaele S., Barhanin J., Fosset M., Lazdunski M., Hosey M. M. (1987). Purification and Characterization of the Dihydropyridine-sensitive Voltage-dependent Calcium Channel from Cardiac Tissue, *J. Biol. Chem.*, **262**, 509—512.
242. Copeland B. R., McConnel H. M. (1980). The Rippled Structure in Bilayer Membranes of Phosphatidylcholine and Binary Mixtures of Phosphatidylcholine and Cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta*, **599**, 95—109.
243. Corey D. P. (1983). Patch Clamp: Current Excitement in Membrane Physiology, *Neuroscience Commentaries*, **1**, 99—110.
244. Cornell R., Vance D. E. (1987). Translocation of CTP: Phosphocholine Cytidyltransferase from Cytosol to Membranes in HeLa Cells: Stimulation by Fatty Acid, Fatty Alcohol, Mono- and Diacylglycerol, *Biochim. Biophys. Acta*, **919**, 26—36.
245. Cornette J. L., Cease K. B., Margalit H., Spouge J. L., Berzofsky J. A., DeLisi C. (1987). Hydrophobicity Scales and Computational Techniques for Detecting Amphipathic Structures in Proteins, *J. Mol. Biol.*, **195**, 659—685.
246. Coronado R. (1986). Recent Advances in Planar Phospholipid Bilayer Techniques for Monitoring Ion Channels, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **15**, 259—277.
247. Correas I., Speicher D. W., Marchesi V. T. (1986). Structure of the Spectrin-Actin Binding Site of Erythrocyte Protein 4.1, *J. Biol. Chem.*, **261**, 13 362—13 366.
248. Cortese J. D., Vidal J. C., Churchill P., McIntyre J. O., Fleischer S. (1982). Reactivation of D-β-Hydroxybutyrate Dehydrogenase with Short-chain Lecithins: Stoichiometry and Kinetic Mechanism, *Biochemistry*, **21**, 3899—3908.
249. Cortese J. D., Fleischer S. (1987). Noncooperative vs. Cooperative Reactivation of D-β-Hydroxybutyrate Dehydrogenase: Multiple Equilibria for Lecithin Binding Are Determined by the Physical State (Soluble vs. Bilayer) and Composition of the Phospholipids, *Biochemistry*, **26**, 5283—5293.
250. Cortijo M., Alonzo A., Gomez-Fernandez J. C., Chapman D. (1982). Intrinsic Protein-Lipid Interactions: Infrared Spectroscopic Studies of Gramicidin A, Bacteriorhodopsin, and Ca^{2+} -ATPase in Biomembranes and Reconstituted Systems, *J. Mol. Biol.*, **157**, 975—618.
251. Cossins A. R., Macdonald A. G. (1986). Homeoviscous Adaptation Under Pressure. III. The Fatty Acid Composition of Liver Mitochondrial Phospholipids of Deep-sea Fish, *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 325—335.
252. Cossins A. R., Sinensky M. (1984). Adaptation of Membranes to Temperature, Pressure, and Exogenous Lipids, *Physiology of Membrane Fluidity* (M. Shinitzky, Ed.), Vol. 2, pp. 1—20, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
253. Costello M. J., Escaig J., Matsushita K., Viitanen P. V., Menick D. R., Kaback H. R. (1987). Purified lac Permease and Cytochrome c Oxidase Are Functional as Monomers, *J. Biol. Chem.*, **262**, 17 072—17 082.
254. Cover W. H., Ryan J. P., Bassford P. J., Walsh K. A., Bollinger J., Randall L. L. (1987). Suppression of a Signal Sequence Mutation by an Amino Acid Substitution in the Mature Portion of the Maltose-Binding Protein, *J. Bacteriology*, **169**, 1794—1800.
255. Cowan A. E., Myles D. G., Koppel D. E. (1987). Lateral Diffusion of the PH-20 Protein on Guinea Pig Sperm: Evidence That Barriers to Diffusion Maintain Plasma Membrane Domains in Mammalian Sperm, *J. Cell Biol.*, **104**, 917—923.
256. Cox G. B., Jans D. A., Fimmel A. I., Gibson F., Hatch L. (1984). The Mechanism of ATP synthase: Conformational Change by Rotation of the β-Subunit, *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 201—208.
257. Cox G. B., Hatch L., Webb D., Fimmel A. L., Lin Z.-H., Senior A. E., Gibson F. (1987). Amino Acid Substitutions in the Epsilon-Subunit of the F_1F_0 -ATPase of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **890**, 195—204.
258. Criado M., Hochschwender S., Sarin V., Fox J. L., Lindstrom J. (1985). Evidence for Unpredicted Transmembrane Domains in Acetylcholine Receptor Subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2004—2008.
259. Croke E., Wickner W. (1987). Trigger Factor: A Soluble Protein That Folds pro-OmpA into a Membrane-assembly-competent Form., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5216—5220.
260. Cross G. A. M. (1987). Eukaryotic Protein Modification and Membrane Attachment via Phosphatidylinositol, *Cell*, **48**, 179—181.
261. Crowther R. A., Klug A. (1975). Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by

- Image Reconstruction from Electron Micrographs, *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 161—182.
262. Cullen J., Phillips M. C., Shipley G. G. (1971). The Effects of Temperature on the Composition and Physical Properties of the Lipids of *Pseudomonas fluorescens*, *Biochem. J.*, **125**, 733—742.
 263. Cullis P. R., de Kruijff B., Hope M. L., Verkleij A. J., Nayar R., Farren S. B., Tilcock C., Madden T. D., Bally M. B. (1983). Structural Properties of Lipids and Their Functional Roles in Biological Membranes, *Membrane Fluidity in Biology* (R. C. Aloia, Ed.), Vol. 1, pp. 39—81, Academic Press, New York.
 264. Cullis P. R., de Kruijff B. (1979). Lipid Polymorphism and the Functional Roles of Lipids in Biological Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 399—420.
 265. Cullis P. R., de Kruijff B., Hope M. J., Verkleij A. J., Nayar R., Farren S. B., Tilcock C., Madden T. D., Bally M. B. (1983). Structural Properties of Lipids and Their Functional Roles in Biological Membranes, *Membrane Fluidity in Biology* (R. C. Aloia, Ed.), Vol. 1, pp. 39—81, Academic Press, New York.
 266. Cullis P. R., de Kruijff B., Hope M. J., Nayar R., Rietveld R., Verkleij A. J. (1980). Structural Properties of Phospholipids in the Rat Liver Inner Mitochondrial Membrane: A ^{31}P -NMR Study, *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 625—635.
 267. Cullis P. R., Hope M. J., Tilcock C. P. S. (1986). Lipid Polymorphism and the Roles of Lipids in Membranes, *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 127—144.
 268. Cunningham B. A. (1986). Cell Adhesion Molecules: A New Perspective on Molecular Embryology, *TIBS*, **11**, 423—426.
 269. Cunningham B. A., Shimotake J. E., Tamura-Lis, Mastran T., Kwok W.-M., Kauffman J. W., Lis L. J. (1986). The Influence of Ion Species in Phosphatidylcholine Bilayer Structure and Packing, *Chem. Phys. Lipids*, **39**, 135—143.
 270. Cunningham B. A., Hemperly J. J., Murray B. A., Prediger E. A., Brackenbury R., Edelman G. M. (1987). Neural Cell Adhesion Molecule: Structure, Immunoglobulin-like Domains, Cell Surface Modulation, and Alternative RNA Splicing, *Science*, **236**, 799—806.
 271. Curatolo W. (1987). Glycolipid Function, *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 137—160.
 272. Curatolo W., Neuringer L. J. (1986). The Effects of Cerebrosides of Model Membrane Shape, *J. Biol. Chem.*, **261**, 17 177—17 182.
 273. Dahl G., Miller T., Paul D., Voellmy R., Werner R. (1987). Expression of Functional Cell-Cell Channels from Cloned Rat Liver Gap Junction Complementary DNA, *Science*, **236**, 1290—1293.
 274. Dahms N. M., Lobel P., Breitmeyer J., Chirgwin J. M., Kornfeld S. (1987). 46-kd Mannose 6-Phosphate Receptor: Cloning Expression, and Homology to the 215-kd Mannose 6-Phosphate Receptor, *Cell*, **50**, 181—192.
 275. Dalbey R. E., Kuhn A., Wickner W. (1987). The Internal Signal Sequence of *Escherichia coli* Leader Peptidase Is Necessary, but Not Sufficient, for Its Rapid Membrane Assembly, *J. Biol. Chem.*, **262**, 13 241—13 245.
 276. Dalbey R. E., Wickner W. (1985). Leader Peptidase Catalyzes the Release of Exported Proteins from the Outer Surface of the *Escherichia coli* Plasma Membrane, *J. Biol. Chem.*, **260**, 15 925—15 931.
 277. Dalbey R. E., Wickner W. (1986). The Role of the Polar, Carboxyl-terminal Domain of *Escherichia coli* Leader Peptidase in Its Translocation across the Plasma Membrane, *J. Biol. Chem.*, **261**, 13 844—13 849.
 278. Dandliker W. B., de Saussure V. A. (1971). Stabilization of Macromolecules by Hydrophobic Bonding: Role of Water Structure and of Chaotropic Ions, *The Chemistry of Biosurfaces* (M. L. Hair, Ed.), pp. 1—43, Marcel Dekker, New York.
 279. Danielli J. F., Davson H. (1935). A Contribution to the Theory of Permeability of Thin Films, *J. Cell Comp. Physiol.*, **5**, 495—508.
 280. Daniels R. S., Downie J. C., Hay A. J., Knossow M., Skehel J. J., Wang M. L., Wiley D. C. (1985). Fusion Mutants of the Influenza Virus Hemagglutinin Glycoprotein, *Cell*, **40**, 431—439.
 281. Danielsen E. M., Cowell G. M. (1986). Biosynthesis of Intestinal Microvillar Proteins, *Biochem. J.*, **240**, 777—782.
 282. Darszon A. (1983). Strategies in the Reassembly of Membrane Protein into Lipid Bilayer Systems and Their Functional Assay, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **15**, 321—334.
 283. Dasseux J.-L., Faucon J.-F., Lafleur M., Pezolet M., Dufourcq J. (1984). A Restatement of Melittin-induced Effects on the Thermotropism of Zwitterionic Phospholipid, *Biochim. Biophys. Acta*, **775**, 7—50.
 284. Daum G. (1985). Lipids of Mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 1—42.
 285. Davey J., Hurtley S. M., Warren G. (1985). Reconstitution of an Endocytic Fusion Event in a Cell-Free System, *Cell*, **43**, 643—652.
 286. Davidson F. F., Dennis E. A., Powell M., Glenney J. R. (1987). Inhibition of Phospholipase A2 by «Lipocortins» and Calpactins, *J. Biol. Chem.*, **262**, 1698—1705.
 287. Davies A., Meeran K., Cairns M. T., Baldwin S. A. (1987). Peptide-specific Antibodies as Probes of the Orientation of the Glucose Transporter in the Human Erythrocyte Membrane, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9347—9352.
 288. Davis C. G., Goldstein J. L., Subhof T. C., Anderson R. G. W., Russell D. W., Brown M. S. (1987). Acid-dependent Ligand Dissociation and Recycling of LDL Receptor Mediated by Growth Factor Homology Region, *Nature*, **326**, 760—765.
 289. Davis C. G., Lehrman M. A., Russell D. W., Anderson R. G. W., Brown M. S., Goldstein J. L. (1986). The J. D. Mutation in Familial Hypercholesterolemia: Amino Acid Substitution in the Cytoplasmic Domain Impedes Internalization of LDL Receptors, *Cell*, **45**, 15—24.
 290. Davis E. O., Henderson P. J. F. (1987). The Cloning and DNA Sequence of the Gene *xyIE* for Xylose-Proton Symport in *Escherichia coli* K12, *J. Biol. Chem.*, **262**, 13 928—13 932.
 291. Davis J. H. (1983). The Description of Membrane Lipid Conformation, Order and Dynamics by ^2H -NMR, *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 117—171.
 292. Davis J. O., Bennett V. (1984). Brain Ankyrin: A Membrane-Associated Protein with Binding Sites for Spectrin, Tubulin, and the Cytoplasmic Domain of the Erythrocyte Anion Channel, *J. Biol. Chem.*, **259**, 13 550—13 559.
 293. Davies J. T., Rideal E. K. (1963). *Interfacial Phenomena*, Academic Press, New York.
 294. Davis L. T., Brobel G. (1987). Nuclear Pore Complex Contains a Family of Glycoproteins That Includes p62; Glycosylation Through a Previously Unidentified Cellular Pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7552—7556.
 295. Davis N. G., Model P. (1985). An Artificial Anchor Domain: Hydrophobicity Suffices to Stop Transfer, *Cell*, **41**, 607—614.
 296. Davison M. D., Findlay J. B. C. (1986). Modification of Ovine Opsin with the Photosensitive Hydrophobic Probe 1-Azido-4-[^{125}I] Iodobenzene, *Biochem. J.*, **234**, 413—420.
 297. Davoust J., Devaux P. F. (1982). Simulation of Electron Spin Resonance Spectra of Spin-Labeled Fatty Acids Covalently Attached to the Boundary of an Intrinsic Membrane Protein. A Chemical Exchange Model, *J. Mag. Res.*, **48**, 475—494.
 298. Dawidowicz E. A. (1987). Dynamics of Membrane Lipid Metabolism and Turnover, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 43—61.
 299. Dawson C. R., Drake A. F., Helliwell J., Hider R. C. (1987). The Interaction of Bee Melittin with Lipid Bilayer Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 75—86.
 300. de Curtis I., Fumagalli G., Borgese N. (1986). Purification and Characterization of

- Two Plasma Membrane Domains from Ejaculated Bull Spermatozoa, *J. Cell Biol.*, **102**, 1813—1825.
301. De Cuyper M., Joniau M. (1985). Spontaneous Intervesicular Transfer of Anionic Phospholipids Differing in the Nature of Their Polar Head Group, *Biochim. Biophys. Acta*, **814**, 374—380.
 302. De Grado W. F., Kezdy F. J., Kaiser E. T. (1981). Design, Synthesis and Characterization of a Cytotoxic Peptide with Melittin-like Activity, *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 679—681.
 303. De Kruijff B. (1987). Polymorphic Regulation of Membrane Lipid Composition, *Nature*, **329**, 587—588.
 304. de Kruijff B., Rietveld A., Telders N., Vaandrager B. (1985). Molecular Aspects of the Bilayer Stabilization Induced by Poly(L-lysines) of Varying Size in Cardiolipin Liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **820**, 295—304.
 305. de Leij L., Witholt B. (1977). Structural Heterogeneity of the Cytoplasmic and Outer Membranes of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **471**, 92—104.
 306. De Lemos-Chiarandini C., Frey A. B., Sabatini D. D., Kreibich C. (1987). Determination of the Membrane Topology of the Phenobarbital-inducible Rat Liver Cytochrome P-450 Isoenzyme PB-4 Using Site-specific Antibodies, *J. Cell Biol.*, **104**, 209—219.
 307. de Rosa M., Gambacorta A., Gliozzi A. (1986). Structure, Biosynthesis, and Physicochemical Properties of Archaeobacterial Lipids, *Microbiological Reviews*, **50**, 70—80.
 308. De Vrije T., Tommassen J., De Kruijff B. (1987). Optimal Posttranslational Translocation of the Precursor of PhoE Protein across *Escherichia coli* Membrane Vesicles Requires both ATP and the Protonmotive Force, *Biochim. Biophys. Acta*, **900**, 63—72.
 309. de Wolf F. A., Groen B. H., van Houte L. P. A., Peters F. A. J., Krab K., Kraayenhof R. (1985). Studies on Well-coupled Photosystem I-enriched Subchloroplast Vesicles. Neutral Red as Probe for External Surface Charge Rather than Internal Protonation, *Biochim. Biophys. Acta*, **809**, 204—214.
 310. Deamer D. W. (1987). Proton Permeation of Lipid Bilayers, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **19**, 457—479.
 311. Deamer D. W., Bramhall J. (1986). Permeability of Lipid Bilayers to Water and Ionic Solutes, *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 167—188.
 312. Deamer D. W., Uster P. S. (1983). Liposome Preparation: Methods and Mechanism, *Liposomes* (M. J. Ostro, Ed.), pp. 27—51, Marcel Dekker, New York.
 313. Deamer D. W., Leonard R., Tardieu A., Branton D. (1970). Lamellar and Hexagonal Lipid Phases Visualized by Freeze-Etching, *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, 47—60.
 314. Deatherage J. F., Henderson R., Capaldi R. A. (1982). Three-dimensional Structure of Cytochrome c Oxidase Vesicle Crystals in Negative Stain, *J. Mol. Biol.*, **158**, 487—499.
 315. Deber C. M., Brandl C. J., Deber R. B., Hsu L. C., Young X. K. (1986). Amino Acid Composition of the Membrane and Aqueous Domains of Integral Membrane Proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**, 68—76.
 316. de Duve C. (1983). Lysosomes Revisited, *Eur. J. Biochem.*, **137**, 391—397.
 317. DeGeorge J. J., Ousley A. H., McCarthy K. D., Morell P., Lapetina E. G. (1987). Glucocorticoids Inhibit the Liberation of Arachidonate but Not the Rapid Production of Phospholipase C-dependent Metabolites in Acetylcholine-stimulated C62B Glimma Cells, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9979—9983.
 318. Deisenhofer J., Michel H., Huber R. (1985). The Structural Basis of Photosynthetic Light Reactions in Bacteria, *TIBS*, **10**, 243—248.
 319. Deisenhofer J., Epp O., Miki K., Huber R., Michel H. (1985). Structure of the Protein Subunits in the Photosynthetic Reaction Centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å Resolution, *Nature*, **318**, 618—621.
 320. Dejter-Juszynski M., Harpaz N., Flowers H. M., Sharon N. (1978). Blood-Group ABH-Specific Macroglycolipids of Human Erythrocytes: Isolation in High Yield from a Crude Membrane Glycoprotein Fraction, *Eur. J. Biochem.*, **83**, 363—378.
 321. DeLong E. F., Yayanos A. A. (1985). Adaptation of the Membrane Lipids of a Deep-Sea Bacterium to Changes in Hydrostatic Pressure, *Science*, **228**, 1101—1103.
 322. Demuth D. R., Showe L. C., Ballantine M., Palumbo A., Fraser P. J., Cioe L., Rovera G., Curtis P. J. (1986). Cloning and Structural Characterization of a Human Non-erythroid Band 3-like Protein, *The EMBO Journal*, **5**, 1205—1214.
 323. Dencher N. A. (1986). Spontaneous Transmembrane Insertion of Membrane Proteins into Lipid Vesicles Facilitated by Short-Chain Lecithins, *Biochemistry*, **25**, 1195—1200.
 324. Dennis E. A. (1983). *Phospholipases*, The Enzymes (P. D. Boyer, Ed.), Vol. **16**, pp. 307—353, Academic Press, New York.
 325. Desaynard C., Debarbouille M., Jolit M., Schwartz M. (1986). Mutations Affecting Antigenic Determinants of an Outer Membrane Protein of *Escherichia coli*, *The EMBO Journal*, **5**, 1383—1388.
 326. Deshaies R. J., Schekman R. (1987). A Yeast Mutant Defective at an Early Stage in Import of Secretory Protein Precursors into the Endoplasmic Reticulum, *J. Cell Biol.*, **105**, 633—645.
 327. Deuticke B., Lutkemeier P., Sistemic M. (1984). Ion Selectivity of Aqueous Leaks Induced in the Erythrocyte Membranes by Crosslinking of Membrane Proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **775**, 150—160.
 328. Devaux P. F. (1983). ESR and NMR Studies of Lipid-Protein Interactions in Membranes, *Biological Magnetic Resonance* (L. J. Berliner and J. Reuben. Eds.), pp. i83—299, Plenum Press, New York.
 329. Devaux P. F., Hoatson G. L., Favre E., Fellmann P., Farren B., MacKay A. L., Bloom M. (1986). Interaction of Cytochrome c with Mixed Dimyristoylphosphatidylcholine-Dimyristoylphosphatidylserine Bilayers: A Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Study, *Biochemistry*, **25**, 3804—3812.
 330. Devaux P. F., Seigneuret M. (1985). Specificity of Lipid-Protein Interaction as Determined by Spectroscopic Techniques, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 63—125.
 331. Diamond J. M., Katz Y. (1974). Interpretation of Nonelectrolyte Partition Coefficients between Dimyristoyl Lecithin and Water, *J. Membrane Biol.*, **17**, 121—154.
 332. Dieckhoff J., Niggemeyer B., Lietzke R., Mannherz H. G. (1987). Reconstitution of Purified Chicken Gizzard 5'-Nucleotidase in Phospholipid Vesicles: Evidence for Its Transmembranous Character and the Existence of Functional Domains on Both Sides of the Phospholipid Bilayer, *Eur. J. Biochem.*, **162**, 451—459.
 333. Dierstein R., Wickner W. (1986). Requirements for Substrate Recognition by Bacterial Leader Peptidase, *The EMBO Journal*, **5**, 427—431.
 334. Dierstein R., Wickner W. (1985). The Leader Region of Pre-maltose Binding Protein Binds Amphiphiles: A Model for Self-Assembly in Protein Export, *J. Biol. Chem.*, **260**, 15 919—15 924.
 335. Dijkstra B. W., Kalk K. H., Drenth J., de Haas G. H., Egmond M. R., Slotboom A. J. (1984). Role of the N-Terminus in the Interaction of Pancreatic Phospholipase A2 with Aggregated Substrates. Properties and Crystal Structure of Transaminated Phospholipase A2, *Biochemistry*, **23**, 2759—2766.
 336. Dill K. A., Flory P. J. (1981). Molecular Organization in Micelles and Vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 676—680.
 337. Divakar S., Easwaran K. R. K. (1987). Conformational Studies of A23187 with Mono-, Di- and Trivalent Metal Ions by Circular Dichroism Spectroscopy, *Biophys. Chem.*, **27**, 139—147.

338. Dixon R. A. P., Sigal I. S., Rands E., Register R. B., Candelore M. R., Blake A. D., Strader C. D. (1987). Ligand Binding to the β -Adrenergic Receptor Involves Its Rhodopsin-like Core, *Nature*, **326**, 75—77.
339. Dixon R. A. F., Sigal I. S., Candelore M. R., Register R. B., Scattergood W., Rands E., Strader C. D. (1987). Structural Features Required for Ligand Binding to the β -Adrenergic Receptor, *The EMBO Journal*, **6**, 3269—3275.
340. Dluhy R. A., Cameron D. G., Mantsch H. H., Mendelsohn R. (1983). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Studies of the Effects of Calcium Ions on Phosphatidylserine, *Biochemistry*, **22**, 6318—6325.
341. Dohlman H. G., Bouvier M., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J. (1987). The Multiple Membrane Spanning Topography of the β_2 -Adrenergic Receptor, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14 282—14 288.
342. Dohlman H. G., Caron M. G., Lefkowitz R. J. (1987). A Family of Receptors Coupled to Guanine Nucleotide Regulatory Proteins, *Biochemistry*, **26**, 2657—2664.
343. Donovan J. J., Simon M. I., Montal M. (1985). Requirements for the Translocation of Diphtheria Toxin Fragment A across Lipid Membranes, *J. Biol. Chem.*, **260**, 8817—8823.
344. Doxsey S. J., Brodsky F. M., Blank G. S., Helenius A. (1987). Inhibition of Endocytosis by Anti-Clathrin Antibodies, *Cell*, **50**, 453—463.
345. Doyle C., Strominger J. L. (1987). Interaction between CD4 and Class II MHC Molecules Mediates Cell Adhesion, *Nature*, **330**, 256—259.
346. Dratz E. A., Van Breemen J. F. L., Kamps K. M. P., Keegstra W., Van Bruggen E. F. J. (1985). Two-dimensional Crystallization of Bovine Rhodopsin, *Biochim. Biophys. Acta*, **832**, 337—342.
347. Dressler V., Haest C. W. M., Plasa G., Deuticke B., Erusalimsky J. D. (1984). Stabilizing Factors of Phospholipid Asymmetry in the Erythrocyte Membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **775**, 189—196.
348. Drews G. (1985). Structure and Functional Organization of Light-Harvesting Complexes and Photochemical Reaction Centers in Membranes of Phototrophic Bacteria, *Microbiol. Rev.*, **49**, 59—70.
349. Dreyfus P., Rieger P., Murawsky M., Garcia L., Lombet A., Fosset M., Pauron D., Barhanin J., Lazdunski M. (1986). The Voltage-dependent Sodium Channel Is Colocalized with the Acetylcholine Receptor at the Vertebrate Neuromuscular Junction, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **139**, 196—201.
350. Duesberg P. H. (1987). Cancer Genes: Rare Recombinants Instead of Activated Oncogenes (A Review), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2117—2124.
351. Dufourc E. J., Smith I. C. (1985). ^2H NMR Evidence for Antibiotic-Induced Cholesterol Immobilization in Biological Model Membranes, *Biochemistry*, **24**, 2420—2424.
352. Dufourc E. J., Smith I. C. P., Jarrell H. C. (1984). Role of Cyclopropane Moieties in the Lipid Properties of Biological Membranes: A ^2H -NMR Structural and Dynamical Approach, *Biochemistry*, **23**, 2300—2309.
353. Dufourcq J., Faucon J.-F., Fourche G., Dasseux J.-L., Le Marie M., Gulik-Krzywicki T. (1986). Morphological Changes of Phosphatidylcholine Bilayers Induced by Melittin: Vesicularization, Fusion, Discoidal Particles, *Biochim. Biophys. Acta*, **859**, 33—48.
354. Dunn R., McCoy J., Simsek M., Majumdar A., Chang S. H., RajBhandary U. L., Khorana H. G. (1981). The Bacteriorhodopsin Gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6744—6748.
355. Dunn R. J., Hackett H. R., McCoy J. M., Chao B. H., Kimura K., Khorana H. G. (1987). Structure-Function Studies on Bacteriorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9246—9254.
356. Dunn S. M. J., Conti-Tronconi B. M., Raftery M. A. (1986). Acetylcholine Receptor Dimers Are Stabilized by Extracellular Disulfide Bonding, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **139**, 830—837.
357. Dunn W. A., Hubbard A. L. (1984). Receptor-mediated Endocytosis of Epidermal Growth Factor by Hepatocytes in the Perfused Rat Liver: Ligand and Receptor Dynamics, *J. Cell Biol.*, **98**, 2148—2159.
358. Dunphy W. G., Rothman J. E. (1985). Compartmental Organization of the Golgi Stack, *Cell*, **42**, 13—21.
359. Dunphy W. G., Pfeffer S. R., Clary D. O., Wattenberg B. W., Glick B. S., Rothman J. E. (1986). Yeast and Mammals Utilize Similar Cytosolic Components to Drive Protein Transport through the Golgi Complex *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1622—1626.
360. Dustin M. L., Selvaraj P., Mattaliano R. J., Springer T. A. (1987). Anchoring Mechanisms for LFA-3 Cell Adhesion Glycoprotein at Membrane Surface, *Nature*, **329**, 846—848.
361. Dux L., Martonosi A. (1983). The Regulation of ATPase-ATPase Interactions in Sarcoplasmic Reticulum Membrane, *J. Biol. Chem.*, **258**, 11 903—11 907.
362. Duzgunes N., Allen T. M., Fedor J., Papahadjopoulos D. (1987). Lipid Mixing During Membrane Aggregation and Fusion: Why Fusion Assays Disagree, *Biochemistry*, **26**, 8435—8442.
- 262a. Dwyer T. M., Adams D. J., Hille B. (1980). The Permeability and the Endplate Channel to Organic Cations in Frog Muscle, *J. Gen. Physiol.*, **75**, 469—492.
363. East J. M., Lee A. G. (1982). Lipid Selectivity of the Calcium and Magnesium Ion Dependent Adenosinetriphosphatase, Studied with Fluorescence Quenching by a Brominated Phospholipid, *Biochemistry*, **21**, 4144—4151.
364. East J. M., Jones O. T., Simmonds A. C., Lee A. G. (1984). Membrane Fluidity Is Not an Important Physiological Regulator of the $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})$ -dependent ATPase of Sarcoplasmic Reticulum, *J. Biol. Chem.*, **259**, 8070—8071.
365. Eble B. E., MacRae D. R., Ligappa V. R., Ganem D. (1987). Multiple Topogenic Sequences Determine the Transmembrane Orientation of Hepatitis B Surface Antigen, *Mol. Cell Biol.*, **7**, 3591—3601.
366. Edidin M. (1981). Molecular Motions and Membrane Organization and Function Membrane Structure (J. B. Finean and R. H. Michell, Eds.), pp. 37—82. Elsevier, New York.
367. Edidin M., Zuniga M. (1984). Lateral Diffusion of Wild-type and Mutant Ld Antigens in L Cells, *J. Cell Biol.*, **99**, 2333—2335.
368. Edmonds D. T. (1987). A Physical Model of Sodium Channel Gating, *Eur. Biophys. J.*, **14**, 195—201.
369. Edwards H. C., Booth A. G. (1987). Calcium-sensitive, Lipid-binding Cytoskeletal Proteins of the Human Placental Microvillar Region, *J. Cell Biol.*, **105**, 303—311.
370. Eilers M., Schatz G. (1986). Binding of a Specific Ligand Inhibits Import of a Purified Precursor Protein into Mitochondria, *Nature*, **322**, 228—232.
371. Eilers M., Oppliger W., Schatz G. (1987). Both ATP and an Energized Inner Membrane Are Required to Import a Purified Precursor Protein into Mitochondria, *The EMBO Journal*, **6**, 1073—1077.
372. Eisenberg D. (1984). Three-dimensional Structure of Membrane and Surface Proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 595—623.
373. Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M., Wall R. (1984). Analyses of Membrane and Surface Protein Sequences with the Hydrophobic Moment Plot, *J. Mol. Biol.*, **179**, 125—142.
374. Eisenberg D., Weiss R. M., Terwilliger T. C. (1984). The Hydrophobic Moment Detects

- Periodicity in Protein Hydrophobicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 140—144.
375. Eisenberg D., Weiss R. M., Terwilliger T. C. (1984). The Helical Hydrophobic Moment: A Measure of the Amphiphilicity of a Helix, *Nature*, **299**, 371—374.
 376. Eisenberg M., Gresalfi T., Riccio T., McLaughlin S. (1979). Adsorption of Monovalent Cations to Bilayer Membranes Containing Negative Phospholipids, *Biochemistry*, **18**, 5213—5223.
 377. Eisenman G., Dani J. A. (1987). An Introduction to Molecular Architecture and Permeability of Ion Channels, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **16**, 205—226.
 378. Eisinger J., Flores J., Petersen W. P. (1986). A Milling Growth Model for Local and Long-Range Obstructed Lateral Diffusion, *Biophys. J.*, **49**, 987—1001.
 379. ElKebbaj M. S., Latruffe N., Monsigny M., Obrenovitch A. (1986). Interaction between apo-(D- β -Hydroxybutyrate dehydrogenase) and Phospholipids Studied by Intrinsic and Extrinsic Fluorescence, *Biochem. J.* **237**, 359—364.
 380. Elgsaeter A., Stokke B. T., Mikkelsen A., Branton D. (1986). The Molecular Basis of Erythrocyte Shape, *Science*, **234**, 1217—1221.
 381. Ellena J. F., Pates R. D., Brown M. F. (1986). ^{31}P NMR Spectra of Rod Outer Segment and Sarcoplasmic Reticulum Membranes Show No Evidence of Immobilized Components due to Lipid-Protein Interactions, *Biochemistry*, **25**, 3742—3748.
 382. Elliot J. R., Murrell R. D., Haydon D. A. (1987). Local Anesthetic Action of Carboxylic Esters: Evidence for the Significance of Molecular Volume and for the Number of Sites Involved, *J. Memb. Biol.*, **95**, 143—149.
 383. Elmes M. L., Scraba D. G., Weiner J. H. (1986). Isolation and Characterization of the Tubular Organelles Induced by Fumarate Reductase Overproduction in *Escherichia coli*, *Journal of General Microbiology*, **132**, 1429—1439.
 384. Engel A., Massalski A., Schindler H., Dorset D. L., Rosenbusch J. P. (1985). Porin Channel Triplets Merge into Single Outlets in *Escherichia coli* Outer Membranes, *Nature*, **317**, 643—645.
 385. Engelman D. M., Goldman A., Steitz T. A. (1982). The Identification of Helical Segments in the Polypeptide Chain of Bacteriorhodopsin, *Methods in Enzymology*, **88**, 81—89.
 386. Engelman D. M., Zaccai G. (1980). Bacteriorhodopsin Is an Inside-Out Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5894—5898.
 387. Engelman D. M., Henderson R., McLachlan A. D., Wallace B. A. (1980). Path of the Polypeptide in Bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2023—2027.
 388. Engelman D. M., Steitz T. A. (1981). The Spontaneous Insertion of Proteins into and across Membranes: The Helical Hairpin Hypothesis, *Cell*, **23**, 411—422.
 389. Engelman D. M., Steitz T. A., Goldman A. (1986). Identifying Nonpolar Transbilayer Helices in Amino Acid Sequences of Membrane Proteins, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **15**, 321—353.
 390. Enoch H. G., Strittmatter P. (1979). Formation and Properties of 1000-Å Diameter, Single-bilayer Phospholipid Vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 145—149.
 391. Enoch H. G., Catala A., Strittmatter P. (1976). Mechanism of Rat Liver Microsomal Stearyl-CoA Desaturase: Studies of the Substrate Specificity, Enzyme-Substrate Interactions and the Function of Lipid, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5095—5103.
 392. Epand R. M., Seyler J. K., Orlowski R. C. (1986). The Hydrophobic Moment of the Amphipathic Helix of Salmon Calcitonin and Biological Potency, *Eur. J. Biochem.*, **159**, 125—127.
 393. Epand R. M., Sturtevant J. M. (1981). A Calorimetric Study of Peptide-Phospholipid Interactions: The Glucagon-Dimyristoyl Phosphatidylcholine Complex., *Biochemistry*, **20**, 4603—4606.
 394. Epand R. M., Hui S.-W., Argan C., Gillespie L. L., Shore G. C. (1986). Structural Analysis and Amphiphilic Properties of a Chemically Synthesized Mitochondrial Signal Peptide, *J. Biol. Chem.*, **261**, 10 017—10 020.
 395. Esmann M., Watts A., March D. (1985). Spin-Label Studies of Lipid-Protein Interactions in (Na^+ , K^+)-ATPase Membranes from Rectal Glands of *Squalus acanthias*, *Biochemistry*, **24**, 1386—1393.
 396. Esmann M., Marsh D. (1985). Spin-Label Studies on the Origin of the Specificity of Lipid-Protein Interactions in (Na^+ , K^+)-ATPase Membranes from *Squalus acanthias*, *Biochemistry*, **24**, 3572—3578.
 397. Esposito G., Carver J. A., Boyd J., Campbell I. D. (1987). High-Resolution ^1H NMR Study of the Solution Structure of Alamethicin, *Biochemistry*, **26**, 1043—1050.
 398. Estep T. N., Mountcastle D. B., Barenholz Y., Biltonen R. L., Thompson T. E. (1979). Thermal Behavior of Synthetic Sphingomyelin-Cholesterol Dispersions, *Biochemistry*, **18**, 2112—2117.
 399. Ettemadi A.-H. (1980). Membrane Asymmetry, A Survey and Critical Appraisal of the Methodology. I. Methods for Assessing the Asymmetric Orientation and Distribution of Proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 347—422.
 400. Evans E. A., Gilmore R., Blobel G. (1986). Purification of Microsomal Signal Peptidase as a Complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 581—585.
 401. Evans T., Brown M. L., Fraser E. D., Northup J. K. (1986). Purification of the Major GTP-binding Proteins from Human Placental Membranes, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7052—7059.
 402. Evans W. H. (1980). A Biochemical Dissection of the Functional Polarity of the Plasma Membrane of the Hepatocyte, *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 27—64.
 403. Evans W. H., Flint N. (1985). Subfractionation of Hepatic Endosomes in Nycodenz Gradients and by Free-flow Electrophoresis, *Biochem. J.*, **232**, 25—32.
 404. Evans W. H., Hardison W. G. M. (1985). Phospholipid, Cholesterol, Polypeptide and Glycoprotein Composition of Hepatic Endosome Subfractions, *Biochem. J.*, **232**, 33—36.
 405. Eytan G. D. (1982). The Use of Liposomes for Reconstitution of Biological Functions, *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 185—202.
 406. Fagan M. H., Dewey T. G. (1986). Resonance Energy Transfer Study of Membrane-bound Aggregates of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase, *J. Biol. Chem.*, **261**, 3654—3660.
 407. Falke J. J., Koshland D. E. (1987). Global Flexibility in a Sensory Receptor: A Site-Directed Cross-Linking Approach, *Science*, **237**, 1596—1600.
 408. Falke J. J., Pace R. J., Chan S. I. (1984). Direct Observation of the Transmembrane Recruitment of Band 3 Transport Sites by Competitive Inhibitors, *J. Biol. Chem.*, **259**, 6481—6491.
 409. Falke J. J., Chan S. I. (1986). Molecular Mechanisms of Band 3 Inhibitors. 2. Channel Blockers, *Biochemistry*, **25**, 7895—7898.
 410. Falke J. J., Chan S. I. (1986). Molecular Mechanisms of Band 3 Inhibitors. 1. Transport Site Inhibitors, *Biochemistry*, **25**, 7888—7894.
 411. Falke J. J., Chan S. I. (1985). Evidence that Anion Transport by Band 3 Proceeds via a Ping-Pong Mechanism Involving a Single Transport Site, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9537—9544.
 412. Falke J. J., Chan S. I. (1986). Molecular Mechanisms of Band 3 Inhibitors. 3. Translocation Inhibitors, *Biochemistry*, **25**, 7899—7906.
 413. Farahbakhsh Z. T., Baldwin R. L., Wisniewski B. J. (1987). Effect of Low pH on the Conformation of *Pseudomonas* Exotoxin A, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2256—2261.
 414. Feigenson G. W. (1986). On the Nature of Calcium Ion Binding between Phosphatidylserine Lamellae, *Biochemistry*, **25**, 5819—5825.

415. Feizi T, Childs R. A. (1985). Carbohydrate Structures of Glycoproteins and Glycolipids as Differentiation Antigens, Tumour-Associated Antigens and Components of Receptor Systems, *TIBS*, **10**, 24—29.
416. Feller D. J., Talvenheimo J. A., Catterall W. A. (1985). The Sodium Channel from Rat Brain, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11 542—11 547.
417. Ferenci T., Silhavy T. J. (1987). Sequence Information Required for Protein Translocation from the Cytoplasm, *J. Bacteriology*, **169**, 5339—5342.
418. Ferguson M. A. J., Low M. G., Cross G. A. M. (1985). Glycosyl-sn-1,2-dimyristoyl-phosphatidylinositol Is Covalently Linked to Trypanosoma brucei Variant Surface Glycoprotein, *J. Biol. Chem.*, **260**, 14 547—14 555.
419. Ferguson S. J. (1985). Fully Delocalised Chemiosmotic or Localised Proton Flow Pathways in Energy Coupling? A Scrutiny of Experimental Evidence, *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 47—95.
420. Fernandez M., Nicholls D. G., Rial E. (1987). The Uncoupling Protein from Brown-adipose-tissue Mitochondria: Chymotrypsin-induced Structural and Functional Modifications, *Eur. J. Biochem.*, **164**, 675—680.
421. Ferro-Novick S., Novick P., Field C., Schekman R. (1984). Yeast Secretory Mutants That Block the Formation of Active Cell Surface Enzymes, *J. Cell Biol.*, **98**, 35—43.
422. Freudl R., MacIntyre S., Degen M., Henning U. (1986). Cell Surface Exposure of the Outer Membrane Protein OmpA of *Escherichia coli* K-12, *J. Mol. Biol.*, **188**, 491—494.
423. Fidelio G. D., Austen B. M., Chapman D., Lucy J. A. (1987). Interactions of Ovalbumin and of Its Putative Signal Sequence with Phospholipid Monolayers, *Biochem. J.*, **244**, 295—301.
424. Fillingame R. H., Peters L. K., White L. K., Mosher M. E., Paule C. R. (1984). Mutations Altering Aspartyl-61 of the Omega Subunit (uncE Protein) of *Escherichia coli* H⁺-ATPase Differ in Effect on Coupled ATP Hydrolysis, *J. Bacteriology*, **158**, 1078—1083.
425. Finean J. B. (1962). The Nature and Stability of the Plasma Membrane, *Circulation*, **26**, 1151—1162.
- 425a. Finean J. B., Coleman R., Michell R. H. (1978). *Membranes and Their Cellular Functions*, 2nd ed., Blackwell, Oxford, UK.
426. Finean J. B., Coleman R., Green W. G., Limbrick A. R. (1966). Low Angle X-ray Diffraction and Electron Microscope Studies of Isolated Cell Membranes, *J. Cell Sci.*, **1**, 287—296.
427. Finean J. B., Burge R. E. (1963). The Determination of the Fourier Transform of the Myelin Layer from a Study of Swelling Phenomena, *J. Mol. Biol.*, **7**, 672—682.
428. Finean J. B., Michell R. H. (1981). Isolation, Composition and General Structure of Membranes, *Membrane Structure* (J. B. Finean and R. H. Michell, Eds.), pp. 1—36, Elsevier, New York.
429. Finer-Moore J., Stroud R. M. (1984). Amphipathic Analysis and Possible Formation of the Ion Channel in an Acetylcholine Receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 155—159.
430. Finkelstein A., Andersen O. S. (1981). The Gramicidin A Channel: A Review of Its Permeability Characteristics with Special Reference to the Single-file Aspect of Transport, *J. Membrane Biol.*, **59**, 155—171.
431. Fischl A. S., Homann M. J., Poole M. A., Carman G. M. (1986). Phosphatidylinositol Synthase from *Saccharomyces cerevisiae*: Reconstitution, Characterization, and Regulation of Activity, *J. Biol. Chem.*, **261**, 3178—3183.
432. Fisher K., Branton D. (1974). Application of the Freeze-Fracture Technique to Natural Membranes, *Methods in Enz.*, **32**, 35—44.
433. Fishman J. B., Fine R. E. (1987). A Trans Golgi-Derived Exocytic Coated Vesicle Can Contain Both Newly Synthesized Cholinesterase and Internalized Transferrin, *Cell*, **48**, 157—164.
434. Fishman P. H. (1986). Recent Advances in Identifying the Functions of Ganglioside, *Chem. Phys. Lipids*, **42**, 137—151.
435. Fleischer S., Packer L. (1974). *Methods in Enzymology*, Vol. 31, Academic Press, New York.
436. Fleischer S., Kervina M. (1974). Subcellular Fractionation of Rat Liver, *Method in Enz.*, **31**, 6—41.
437. Rogers M. J., Strittmatter P. (1975). The Interaction of NADH-Cytochrome b₅ Reductase and Cytochrome b₅ Bound to Egg Lecithin Liposomes, *J. Biol. Chem.*, **250**, 5713—5718.
438. Flewelling R. F., Hubbell W. L. (1986). The Membrane Dipole Potential in a Total Membrane Potential Model, *Biophys. J.*, **49**, 541—552.
439. Flewelling R. F., Hubbell W. L. (1986). Hydrophobic Ion Interactions with Membranes: Thermodynamic Analysis of Tetraphenylphosphonium Binding to Vesicles, *Biophys. J.*, **49**, 531—540.
440. Fliesler S. J., Basinger S. F. (1985). Tunicamycin Blocks the Incorporation of Opsin into Retinal Rod Outer Segment Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1116—1120.
441. Flinta C., von Heijne G., Johansson J. (1983). Helical Sidedness and the Distribution of Polar Residues in Trans-membrane Helices, *J. Mol. Biol.*, **168**, 193—196.
442. Flugge U. I., Hinz G. (1986). Energy Dependence of Protein Translocation into Chloroplasts, *Eur. J. Biochem.*, **160**, 563—570.
443. Fluhler E., Burnham V. G., Loew L. M. (1985). Spectra, Membrane Binding, and Potentiometric Responses of New Charge Shift Probes, *Biochemistry*, **24**, 5749—5755.
444. Fong H. K. W., Amatruda T. I. III, Birren B. W., Simon M. I. (1987). Distinct Forms of the β Subunit of GTP-Binding Regulatory Proteins Identified by Molecular Cloning, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 792—3796.
445. Fong T. M., McNamee M. G. (1986). Correlation between Acetylcholine Receptor Function and Structural Properties of Membranes, *Biochemistry*, **25**, 830—840.
446. Forbush B. III (1987). Rapid Release of ⁴²K⁺ or ⁸⁶Rb⁺ from Two Distinct Transport Sites on the Na, K-Pump in the Presence of P_i or Vanadate, *J. Biol. Chem.*, **262**, 11 116—11 127.
447. Forbush B. III (1987). Rapid Release of ⁴²K⁺ and ⁸⁶Rb⁺ from an Occluded State of the Na, K-Pump in the Presence of ATP or ADP, *J. Biol. Chem.*, **262**, 11 104—11 115.
448. Ford R. C., Picot D., Garavito R. M. (1987). Crystallization of the Photosystem I Reaction Centre, *The EMBO Journal*, **6**, 1581—1586.
449. Forman S. D., Nemerson Y. (1986). Membrane-dependent Coagulation Reaction Is Independent of the Concentration of Phospholipid-bound Substrate: Fluid Phase Factor X Regulates the Extrinsic System, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4675—4679.
450. Forrest B. J., Mattai J. (1985). ²H and ³¹P NMR Study of the Interaction of General Anesthetics with Phosphatidylcholine Membranes, *Biochemistry*, **24**, 7148—7153.
451. Forte M., Guy H. R., Mannella C. A. (1987). Molecular Genetics of the VDAC Ion Channel: Structural Model and Sequence Analysis, *J. Bionerg. Biomemb.*, **19**, 341—350.
452. Foster D. L., Fillingame R. H. (1982). Stoichiometry of Subunits in the H⁺-ATPase Complex of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2009—2015.
453. Foster D. L., Boublik M., Kaback H. R. (1983). Structure of the lac Carrier Protein of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **258**, 31—34.
454. Foster D. L., Mowbray S. L., Jap B. K., Koshland D. E. (1985). Purification and

- Characterization of the Aspartate Chemoreceptor, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11 706—11 710.
455. Fox J. F. B. (1985). Identification of Actin-Binding Protein as the Protein Linking Membrane Skeleton to Glycoproteins on Platelet Plasma Membrane, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11 970—11 977.
 456. Fox R. O., Richards F. M. (1982). A Voltage-gated Ion Channel Model Inferred from the Crystal Structure of Alamethicin at 1.5 Å Resolution, *Nature*, **300**, 325—330.
 457. Franck P. F. H., Op den Kamp J. A. F., Roelofs B., van Deenen L. L. M. (1986). Does Diamide Treatment of Intact Human Erythrocytes Cause Loss of Phospholipid Asymmetry? *Biochim. Biophys. Acta*, **857**, 127—130.
 458. Franke W. W. (1987). Nuclear Lamins and Cytoplasmic Intermediate Filament Proteins: A Growing Multigene Family, *Cell*, **48**, 3—4.
 459. Franke W. W., Scheer U. (1970). The Ultrastructure of the Nuclear Envelope of Amphibian Oocytes: A Reinvestigation. I. The Mature Oocyte, *J. Ultrastruct. Res.*, **30**, 288—316.
 460. Franks F., England D. (1975). The Role of Solvent Interactions in Protein Conformation, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **3**, 165—219.
 461. Franks N. P. (1976). Structural Analysis of Hydrated Egg Lecithin in Cholesterol Bilayers I. X-ray Diffraction, *J. Mol. Biol.*, **100**, 345—358.
 462. Franks N. P., Lieb W. R. (1984). Do General Anaesthetics Act by Competitive Binding to Specific Receptors? *Nature*, **310**, 599—601.
 463. Freedman R. B. (1981). Membrane-bound Enzymes, Membrane Structure (J. B. Finean and R. H. Michel, Eds.), pp. 161—214, Elsevier, New York.
 464. Frelinger A. L., Rutishauser U. (1986). Topography of N-CAM Structural and Functional Determinants. II. Placement of Monoclonal Antibody Epitopes, *J. Cell Biol.*, **103**, 1729—1737.
 465. French J. S., Guengerich F. P., Coon M. J. (1980). Interactions of Cytochrome P-450, NADPH-Cytochrome P-450 Reductase, Phospholipid, and Substrate in the Reconstituted Liver Microsomal Enzyme System, *J. Biol. Chem.*, **255**, 4112—4119.
 466. Frey T. G., Costello M. J., Karlsson B., Haselgrove J. C., Leigh J. S. (1982). Structure of the Cytochrome Oxidase Dimer: Electron Microscopy of Two-dimensional Crystals, *J. Mol. Biol.*, **162**, 113—130.
 467. Frolich O., Gunn R. B. (1986). Erythrocyte Anion Transport: The Kinetics of a Single-site Obligatory Exchange System, *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 169—194.
 468. Frye L. D., Edidin M. (1970). The Rapid Intermixing of Cell Surface Antigens After Formation of Mouse-Human Heterokaryons, *J. Cell Sci.*, **7**, 319—335.
 469. Fukuda M., Lauffenburger M., Sasaki H., Rogers M. E., Dell A. (1987). Structures of Novel Sialylated O-Linked Oligosaccharides Isolated from Human Erythrocyte Glycophorins, *J. Biol. Chem.*, **262**, 11 925—11 957.
 470. Fukushima D., Kupferberg J. P., Yokoyama S., Kroon D. J., Kaiser E. T., Kezdy F. J. (1979). A Synthetic Amphiphilic Helical Dodecapeptide with the Surface Properties of Plasma Apolipoprotein A—I, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3703—3704.
 471. Fuller S. D., Simons K. (1986). Transferrin Receptor Polarity and Recycling Accuracy in "Tight" and "Leaky" Strains of Madin-Darby Canine Kidney Cells, *J. Cell Biol.*, **103**, 1767—1779.
 472. Furst P., Solioz M. (1985). The Vandate-sensitive ATPase of *Streptococcus faecalis* Pumps Potassium in a Reconstituted System, *J. Biol. Chem.*, **261**, 4302—4308.
 473. Furth A. J. (1980). Removing Unbound Detergent from Hydrophobic Proteins, *Anal. Biochem.*, **109**, 207—215.
 474. Furthmayr H., Marchesi V. T. (1976). Subunit Structure of Human Erythrocyte Glycophorin A, *Biochemistry*, **15**, 1137—1143.
 475. Furthmayr H. (1978). Structural Comparison of Glycophorins and Immunochemical Analysis of Genetic Variants, *Nature (London)*, **271**, 519—524.
 476. Futai M., Kanazawa H. (1983). Structure and Function of Proton Translocating Adenosine Triphosphatase: Biochemical and Molecular Biological Approaches, *Microbiol. Rev.*, **47**, 285—312.
 477. Gaber B. P., Peticolas W. L. (1977). On the Quantitative Interpretation of Biomembrane Structure by Raman Spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **465**, 260—274.
 478. Gabriel N. E., Roberts M. F. (1984). Spontaneous Formation of Stable Unilamellar Vesicles, *Biochemistry*, **23**, 4011—4015.
 479. Gabriel N. E., Roberts M. F. (1986). Interaction of Short-Chain Lecithin with Long-Chain Phospholipids: Characterization of Vesicles That Form Spontaneously, *Biochemistry*, **25**, 2812—2821.
 480. Caffney B. J. (1985). Chemical and Biochemical Crosslinking of Membrane Components, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 289—317.
 481. Gahmberg C. G. (1981). Membrane Glycoproteins and Glycolipids: Structure, Localization and Function of the Carbohydrate, Membrane Structure (J. B. Finean and R. H. Michel, Eds.), pp. 127—160, Elsevier, New York.
 482. Gaines G. L. (1966). Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, Interscience Publishers, a division of John Wiley and Sons, Inc., New York.
 483. Galla H. J., Hartman W., Theilen U., Sackmann E. (1979). On Two-dimensional Passive Random Walls in Lipid Bilayers and Fluid Pathways in Biomembranes, *J. Membrane Biol.*, **48**, 215—236.
 484. Gallatin M., John T. P. S., Siegelman M., Reichert R., Butcher E. C., Weissman I. L. (1986). Lymphocyte Homing Receptors, *Cell*, **44**, 673—680.
 485. Gallin W. J., Sorkin B. C., Edelman G. M., Cunningham B. A. (1987). Sequence Analysis of a cDNA Clone Encoding the Liver Cell Adhesion Molecule, L-CAM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2808—2812.
 486. Gally H. U., Pluschke G., Overath P., Seelig J. (1980). Structure of *Escherichia coli* Membranes. Fatty Acyl Chain Order Parameters of Inner and Outer Membranes and Derived Liposomes, *Biochemistry*, **19**, 1638—1634.
 487. Gally H. U., Pluschke G., Overath P., Seelig J. (1979). Structure of *Escherichia coli* Membranes. Phospholipid Conformation in Model Membranes and Cells as Studied by Deuterium Magnetic Resonance, *Biochemistry*, **18**, 5605—5610.
 488. Ganong B. R., Bell R. M. (1984). Transmembrane Movement of Phosphatidylglycerol and Diacylglycerol Sulfhydryl Analogues, *Biochemistry*, **23**, 4977—4983.
 489. Gao B., Mumby S., Gilman A. G. (1987). The G Protein β_2 Complementary DNA Encodes the β_{35} Subunit, *J. Biol. Chem.*, **262**, 17 254—17 257.
 490. Garavito R. M., Jenkins J., Jansonius J. N., Karlsson R., Rosenbush J. P. (1983). X-ray Diffraction Analysis of Matrix Porin, an Integral Membrane Protein from *Escherichia coli* Outer Membrane, *J. Mol. Biol.*, **164**, 313—327.
 491. Garavito R. M., Hinz U., Neuhaus J. M. (1984). The Crystallization of Outer Membrane Proteins from *Escherichia coli*: Studies on LamB and ompA Gene Products, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4254—4257.
 492. Garcia M. L., Kitada M., Elsenstein H. C., Krulwich T. A. (1984). Voltage-Dependent Proton Fluxes in Liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **766**, 109—115.
 493. Garcia P. D., Ghayeb J., Inouye M., Walter P. (1987). Wild Type and Mutant Signal Peptides of *Escherichia coli* Outer Membrane Lipoprotein Interact with Equal Efficiency with Mammalian Signal Recognition Particle, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9463—9468.
 494. Gardas A. (1976). A Structural Study on a Macrolycolipid Containing 22 Sugars Isolated from Human Erythrocytes, *Eur. J. Biochem.*, **68**, 177—183.

495. Gardel C., Benson S., Hunt J., Michaelis S., Beckwith J. (1987). secD, a New Gene Involved in Protein Export in *Escherichia coli*, J. Bacteriology, **169**, 1286—1290.
496. Garland P.B. (1984). Optical Probes and the Detection of Conformational Changes in Membrane Proteins, Biological Membranes (D. Chapman, Ed.), Vol. 5, pp. 279—288, Academic Press, New York.
497. Geiger B. (1983). Membrane-Cytoskeleton Interaction, Biochim. Biophys. Acta, **737**, 305—341.
498. Geiger B. (1985). Microfilament-Membrane Interaction, TIBS, **10**, 456—461.
499. Geisow M.J. (1986). Common Domain Structure of Ca^{2+} and Lipid-Binding Proteins, FEBS Lett., **203**, 99—103.
500. Geller R.L., Movva N.R., Wickner W. (1986). Both ATP and the Electrochemical Potential Are Required for Optimal Assembly of pro-OmpA into *Escherichia coli* Inner Membrane Vesicles, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 4219—4222.
501. Geller B.L., Wickner W. (1985). M13 Procoat Inserts into Liposomes in the Absence of Other Membrane Proteins, J. Biol. Chem., **260**, 13 281—13 285.
502. Gelles J., Blair D.F., Chan S.I. (1987). The Proton-pumping Site of Cytochrome c Oxidase: A Model of Its Structure and Mechanism, Biochim. Biophys. Acta, **853**, 205—236.
503. Gennis R.B., Jonas A. (1977). Protein Lipid Interactions, Ann. Rev. of Biophys. and Bioeng., **6**, 195—238.
504. Gennis R.B., Sinensky M., Strominger J.L. (1976). Activation of C55-Isoprenoid Alcohol Phosphokinase from *Staphylococcus aureus*, J. Biol. Chem., **251**, 1270—1276.
505. Georgallas A., Hunter D.L., Lookman T., Zuckermann M.J., Pink D.A. (1984). Interactions Between Two Sheets of a Bilayer Membrane and Its Internal Lateral Pressure, Eur. Biophys. J., **11**, 79—86.
506. Gerber G.E., Gray C.P., Wildenauer D., Khorana H.G. (1977). Orientation of Bacteriorhodopsin in Halobacterium halobium as Studied by Selective Proteolysis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 5426—5430.
507. Georgatos S.D., Weber K., Geisler N., Blobel G. (1987). Binding of Two Desmin Derivatives to the Plasma Membrane and the Nuclear Envelope of Avian Erythrocytes: Evidence for a Conserved Site-specificity in Intermediate Filament-Membrane Interactions, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 6780—6784.
508. Gerlach J.H., Endicott J.A., Juranka P.F., Henderson G., Sarangi F., Deuchars K.L., Ling V. (1986). Homology between P-glycoprotein and a Bacterial Haemolysin Transport Protein Suggests a Model for Multidrug Resistance, Nature, **324**, 485—489.
509. Gething M.-J., McCammon K., Sambrook J. (1986). Expressing of Wild-Type and Mutant Forms of Influenza Hemagglutinin: The Role of Folding in Intracellular Transport, Cell, **46**, 939—950.
510. Gething M.-J., Doms R.W., York D., White J. (1986). Studies on the Mechanism of Membrane Fusion: Site-specific Mutagenesis of the Haemagglutinin of Influenza Virus, J. Cell Biol., **102**, 11—23.
511. Gauze H.J., Slott J.W., Schwartz A.L. (1987). Membranes of Sorting Organelles Display Lateral Heterogeneity in Receptor Distribution, J. Cell Biol., **104**, 1715—1723.
512. Gil G., Faust J.R., Chin D.J., Goldstein J.L., Brown M.S. (1985). Membrane-Bound Domain of HMG CoA Reductase Is Required for Sterol-Enhanced Degradation of the Enzyme, Cell, **41**, 249—258.
513. Gillespie L.L. (1987). Identification of an Outer Mitochondrial Membrane Protein That Interacts with a Synthetic Signal Peptide, J. Biol. Chem., **262**, 7939—7942.
514. Gillespie L.L., Argan C., Taneja A.T., Hodges R.S., Freeman K.B., Shore G.C. (1985). A Synthetic Signal Peptide Blocks Import of Precursor Proteins Destined for the Mitochondrial Inner Membrane or Matrix, J. Biol. Chem., **260**, 16 045—16 048.
515. Gilman A.G. (1987). G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals, Ann. Rev. Biochem., **56**, 615—649.
516. Giugni T.D., James L.C., Haigler H.T. (1985). Epidermal Growth Factor Stimulates Tyrosine Phosphorylation of Specific Proteins in Permeabilized Human Fibroblasts, J. Biol. Chem., **260**, 15 081—15 090.
517. Giugni T.D., Braslau D.L., Haigler H.T. (1987). Electric Field-induced Redistribution and Postfield Relaxation of Epidermal Growth Factor Receptors on A431 Cells, J. Cell. Biol., **104**, 1291—1297.
518. Glaeser R.M., Jap B.K. (1985). Absorption Flattening in the Circular Dichroism Spectra of Small Membrane Fragments, Biochemistry, **24**, 6398—6401.
519. Glenney J.R., Glenney P. (1983). Fodrin Is the General Spectrin-Like Protein Found in Most Cells Whereas Spectrin and the TW Protein Have a Restricted Distribution, Cell, **34**, 503—512.
520. Glick B.S., Rothman J.E. (1987). Possible Role for Fatty Acyl-Coenzyme A in Intracellular Protein Transport, Nature, **326**, 309—312.
521. Goins B., Masserini M., Barisas B.G., Freire E. (1986). Lateral Diffusion of Ganglioside GM₁ in Phospholipid Bilayer Membranes, Biophys. J., **49**, 849—856.
522. Golan D.E., Alecio M.R., Veatch W.R., Rando R.R. (1984). Lateral Mobility of Phospholipid and Cholesterol in the Human Erythrocyte Membrane: Effects of Protein-Lipid Interaction, Biochemistry, **23**, 332—339.
523. Goldfarb D.S., Garipey J., Schoolnik G., Kornberg R.S. (1986). Synthetic Peptides as Nuclear Localization Signals, Nature, **322**, 641—644.
524. Goldkorn T., Rimon G., Kempner E.S., Kaback H.R. (1984). Functional Molecular Weight of the lac Carrier Protein from *Escherichia coli* as Studied by Radiation Inactivation Analysis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 1021—1025.
525. Goldman D., Deneris E., Luyten W., Kochhar A., Patrick J., Heineman S. (1987). Members of a Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family Are Expressed in Different Regions of the Mammalian Central Nervous System, Cell, **48**, 965—973.
526. Gomez-Fernandez J.C., Goni F.M., Back D., Restall C., Chapman D. (1980). Protein Lipid Interactions: Biophysical Studies of (Ca^{2+} + Mg^{2+})-ATPase Reconstituted Systems, Biochim. Biophys. Acta, **598**, 502—516.
527. Gonnene A., Ernst R. (1978). Solubilization of Membrane Proteins by Sulfobetaines, Novel Zwitterionic Surfactants, Anal. Biochem., **87**, 28—38.
528. Goormaghtigh E., Chadwick C., Scarborough G.A. (1986). Monomers of the Neurospora Plasma Membrane H^{+} -ATPase Catalyze Efficient Proton Translocation, J. Biol. Chem., **261**, 7466—7471.
529. Goormaghtigh E., Scarborough G.A. (1986). Density-Based Separation of Liposomes by Glycerol Gradient Centrifugation, Analytical Biochemistry, **159**, 122—131.
530. Goormaghtigh E., Brasseur R., Huart P., Ruyschaert J.M. (1987). Study of the Adriamycin-Cardiolipin Complex Structure Using Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy, Biochemistry, **26**, 1789—1794.
531. Gordon R.D., Fieles W.E., Schotland D.L., Hogue-Angeletti R., Barchi R.L. (1987). Topographical Localization of the C-terminal Region of the Voltage-dependent Sodium Channel from *Electrophorus electricus* Using Antibodies Raised Against a Synthetic Peptide, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 308—312.
532. Gorter E., Grendel F. (1925). On Biomolecular Layers of Lipid on the Chromocytes of the Blood, J. Exp. Med., **41**, 439—443.
533. Gounaris K., Barbar J. (1983). Monogalactosyldiacylglycerol: The Most Abundant Polar Lipid in Nature, TIBS, **8**, 378—381.
534. Gounaris K., Barber J., Harwood J.L. (1986). The Thylakoid Membranes of Higher Plant Chloroplasts, Biochem. J., **237**, 313—326.

535. Govil G., Hosur R.V. (1982). Conformation of Biological Molecules: New Results for NMR, Springer-Verlag, New York.
536. Grabau C., Cronan J.E. (1986). In Vivo Function of *Escherichia coli* Pyruvate Oxidase Specifically Requires a Functional Lipid Binding Site, *Biochemistry*, **25**, 3748—3751.
537. Graf J., Ogle R.C., Robey F.A., Sasaki M., Martin G.R., Yamada Y., Kleinman H.K. (1987). A Pentapeptide from the Laminin BI Chain Mediates Cell Adhesion and Binds the 67000 Laminin Receptor, *Biochemistry*, **26**, 6896—6900.
538. Graham I., Gagne J., Silvius J.R. (1985). Kinetics and Thermodynamics of Calcium-Induced Lateral Rhase Separations in Phosphatidic Acid Containing Bilayers, *Biochemistry*, **24**, 7123—7131.
539. Grant C.W.M. (1984). Cell Surface Structural Implications of Some Experiments with Isolated Glycolipids and Glycoproteins, *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **62**, 1151—1157.
540. Grasberger B., Minton A.P., DeLisi C., Metzger H. (1986). Interaction between Proteins Localized in Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6258—6262.
541. Gray T.M., Mathews B.W. (1984). Intrahelical Hydrogen Binding of Serine, Threonine and Cysteine Residues within alpha-Helices and Its Relevance to Membrane-bound Proteins, *J. Mol. Biol.*, **175**, 75—81.
542. Green D.E., Perdue J.F. (1966). Correlation of Mitochondrial Structure and Function, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **137**, 667—684.
543. Green D.E., Fleischer S. (1963). The Role of Lipids in Mitochondrial Electron Transfers and Oxidative Phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 554—582.
544. Green P.R., Bell R.M. (1984). Asymmetric Reconstitution of Homogeneous *Escherichia coli* sn-Glycerol-3-phosphate Acyltransferase into Phospholipid Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **259**, 14 688—14 694.
545. Greenberg M., Tsong T.Y. (1984). Detergent Solubilization and Affinity Purification of a Local Anesthetic Binding Protein from Mammalian Axonal Membranes, *J. Biol. Chem.*, **259**, 13 241—13 245.
546. Greenblatt R.E., Blatt Y., Montal M. (1985). The Structure of the Voltage-sensitive Sodium Channel, *FEBS Lett.*, **193**, 125—134.
547. Greenhut S.F., Bourgeois V.R., Roseman M.A. (1986). Distribution of Cytochrome *b₅* between Small and Large Unilamellar Phospholipid Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **261**, 3670—3675.
548. Grenier F.C., Waygood E.B., Saier M.H. (1986). The Bacterial Phosphotransferase System: Kinetic Characterization of the Glucose, Mannitol, Glucitol, and N-Acetylglucosamine Systems, *J. Cell. Biochem.*, **31**, 97—105.
549. Grenningloh G., Rienitz A., Schmitt B., Methfessel C., Zensen M., Beyreuther K., Gundelfinger E.D., Betz H. (1987). The Strychnine-binding Subunit of the Glycine Receptor Shows Homology with Nicotinic Acetylcholine Receptors, *Nature*, **328**, 215—220.
550. Griffith O.H., McMillen D.A., Keana J.F.W., Jost P.C. (1986). Lipid-Protein Interactions in Cytochrome c Oxidase. A Comparison of Covalently Attached Phospholipid Photo-Spin-Label with Label Free to Diffuse in the Bilayer, *Biochemistry*, **25**, 574—584.
551. Griffith O.H., Dehlinger P.J., Van S.P. (1974). Shape of the Hydrophobic Barrier of Phospholipid Bilayer: Evidence for Water Penetration in Biological Membranes, *J. Membrane Biol.*, **15**, 159—192.
552. Griffiths G., Simons K. (1986). The trans Golgi Network: Sorting at the Exit Site of the Golgi Complex, *Science*, **234**, 438—443.
553. Grimes H.D., Watanabe N.M., Breidenbach R.W. (1986). Plasma Membrane Isolated with a Defined Orientation Used to Investigate Protein Topography, *Biochim. Biophys. Acta*, **862**, 165—177.
554. Gross R.W. (1985). Identification of Plasmalogen as the Major Phospholipid Constituent of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum, *Biochemistry*, **24**, 1662—1668.
555. Gruenberg J.E., Howell K.E. (1986). Reconstitution of Vesicle Fusions Occurring in Endocytosis with a Cell-Free System. The EMBO Journal, **5**, 3091—3101.
556. Grygorczyk P., Schwarz W., Passow H. (1987). Potential Dependence of the "Electrically Silent" Anion Exchange across the Plasma Membrane of *Xenopus* Oocytes Mediated by the Band-3 Protein, *J. Membrane Biol.*, **99**, 127—136.
557. Guan J., Machamer C.E., Rose J.K. (1985). Glycosylation Allows Cell-Surface Transport of an Anchored Secretory Protein, *Cell*, **42**, 489—496.
558. Guidotti G. (1976). The Structure of Membrane Transport System, *TIPS*, **1**, 11—13.
559. Guillet J.-G., Lai M.-Z., Briner T.J., Smith J.A., Gefter M.L. (1986). Interaction of Peptide Antigens and Class II Major Histocompatibility Complex Antigens, *Nature*, **324**, 260—262.
560. Gumbiner B., Louvard D. (1985). Localized Barriers in the Plasma Membrane: A Common Way to Form Domains, *TIBS*, **10**, 435—438.
561. Gut J., Richter C., Cherry R.J., Winterhalter K.H., Kawato S. (1982). Rotation of Cytochrome P-450. II. Specific Interactions of Cytochrome P-450 with NADPH-Cytochrome P-450 Reductase in Phospholipid Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **257**, 7030—7036.
562. Gutknecht J. (1987). Proton Conductance Through Phospholipid Bilayers: Water Wires or Weak Acids? *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **19**, 427—442.
563. Gutknecht J. (1984). Proton/Hydroxide Conductance through Lipid Bilayer Membranes, *J. Membrane Biol.*, **82**, 105—112.
564. Guy H.R., Hucho F. (1987). The Ion Channel of the Nicotinic Acetylcholine Receptor, *TINS*, **10**, 318—321.
565. Guy H.R., Seetharamulu P. (1986). Molecular Model of the Action Potential Sodium Channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 508—512.
566. Habermann V.E., Jentsch J. (1967). Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und Peptischen Spaltstücken, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 37—50.
567. Hackenberg H., Klingenberg M. (1980). Molecular Weight and Hydrodynamic Parameters of the Adenosine 5'-Diphosphate-Adenosine 5'-Triphosphate Carrier in Triton X-100, *Biochemistry*, **19**, 548—555.
568. Hackenbrock C.R., Chazotte B., Gupta S.S. (1986). The Random Collision Model and a Critical Assessment of Diffusion and Collision in Mitochondrial Electron Transport, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **18**, 331—368.
569. Hackett C.S., Strittmatter P. (1984). Covalent Cross-linking of the Active Sites of Vesicle-bound Cytochrome *b₅* and NADPH-Cytochrome *b₅* Reductase, *J. Biol. Chem.*, **259**, 3275—3282.
570. Hackett N.R., Stern L.J., Chao B.H., Kronis K.A., Khorana H.G. (1987). Structure-Function Studies on Bacteriorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9277—9284.
571. Haest C.W.M. (1982). Interactions Between Membrane Skeleton Proteins and the Erythrocyte Membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 331—352.
572. Hager K.M., Mandala S.M., Davenport J.W., Speicher D.W., Benz E.Jr., Slayman C.W. (1986). Amino Acid Sequence of the Plasma Membrane ATPase of *Neurospora crassa*: Deduction from Genomic and cDNA Sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7693—7697.
573. Hakomori S. (1984). Glycosphingolipids as Differentiation-Dependent, Tumor-Associated Markers and as Regulators of Cell Proliferation, *TIBS*, **9**, 453—458.
574. Hall P.F. (1984). The Role of the Cytoskeleton in Hormone Action *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **62**, 653—665.
575. Hall T.G., Bennett V. (1987). Regulatory Domains of Erythrocyte Ankyrin, *J. Biol. Chem.*, **262**, 10 537—10 545.
576. Hanahan D.J. (1986). Platelet Activating Factor: A Biologically Active Phosphoglyceride, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 483—509.

577. Hanahan D.J., Nelson D.R. (1984). Phospholipids as Dynamic Participants in Biological Processes, *J. Lipid Res.*, **25**, 1528—1535.
578. Hanamoto J.H., Dupuis P., El-Sayed M.A. (1984). On the Protein (Tyrosine)-Chromophore (Protonated Schiff Base) Coupling in Bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7083—7087.
579. Hancock R.E.W. (1987). Role of Porins in Outer Membrane Permeability, *J. Bacteriology*, **169**, 920—933.
580. Hancock R.E.W., Schmidt A., Bauer K., Benz R. (1986). Role of Lisines in Ion Selectivity of Bacterial Outer Membrane Porins *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 263—267.
581. Handa M., Titani K., Holland L.Z., Roberts J.R., Ruggeri Z.M. (1986). The von Willebrand Factor-binding Domain of Platelet Membrane Glycoprotein Ib: Characterization by Monoclonal Antibodies and Partial Amino Acid Sequence Analysis of Proteolytic Fragments, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12 579—12 585.
582. Hanke W. (1986). Reconstitution of Ion Channels, *CRC Critical Reviews in Biochem.*, **19**, 1—44.
583. Hannig K. (1979). Continuous Free-flow Electrophoresis. Separation of Cells and Subcellular Elements (H. Peeters, Ed.), pp. 23—30, Pergamon Press, New York.
584. Hannig K., Heidrich H.-G. (1974). The Use of Continuous Preparative Free-Flow Electrophoresis for Dissociating Cell Fractions and Isolation of Membranous Components, *Methods in Enz.*, **31**, 746—761.
585. Hannun Y.A., Loomis C.R., Merrill A.H.Jr., Bell R.M. (1986). Sphingosine Inhibition of Protein Kinase C Activity and of Phorbol Dibutyrate Binding in Vitro and in Human Platelets, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12 604—12 609.
586. Hannun Y.A., Loomis C.R., Bell R.M. (1986). Protein Kinase C Activation in Mixed Micelles: Mechanistic Implications of Phospholipid, Diacylglycerol, and Calcium Interdependencies, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7184—7190.
587. Hannun Y.A., Bell R.M. (1987). Lysophingolipids Inhibit Protein Kinase C: Implications for the Sphingolipidoses, *Science*, **235**, 670—674.
588. Hannun Y.A., Bell R.M. (1986). Phorbol Ester Binding and Activation of Protein Kinase C in Triton X-100 Mixed Micelles Containing Phosphatidylserine, *J. Biol. Chem.*, **261**, 9341—9347.
589. Hansen W., Garcia P.D., Walter P. (1986). In Vitro Protein Translocation across the Yeast Endoplasmic Reticulum: ATP-Dependent Posttranslational Translocation of the Prepro- α -Factor, *Cell*, **45**, 397—406.
590. Hanson B.A., Lester R.L. (1980). The Extraction of Inositol-containing Phospholipids and Phosphatidylcholine from *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa*, *J. Lipid Res.*, **21**, 309—315.
591. Hantke K., Braun V. (1973). Covalent Binding of Lipid to Protein: Diglyceride and Amide-Linked Fatty Acid at the N-Terminal End of the Murein-Lipoprotein of the *E. coli* Outer Membrane, *Eur. J. Biochem.*, **34**, 284—296.
592. Hanukoglu I., Hanukoglu Z. (1986). Stoichiometry of Mitochondrial Cytochromes P-450. Adrenodoxin and Adrenodoxin Reductase in Adrenal Cortex and Corpus Luteum: Implications for Membrane Organization and Gene Regulation, *Eur. J. Biochem.*, **157**, 27—31.
593. Hargrave P.A. (1986). Topography of Membrane Proteins. Determination of Regions Exposed to the Aqueous Phase. Techniques for the Analysis of Membrane Proteins (C.I. Ragan and R.J. Cherry, Eds.), pp. 129—151, Chapman and Hall, New York.
- 593a. Hargrave P.A., McDowell J.H., Curtis D.R., Wang J.K., Juszczak E., Fong S.-L., Rao J.K.M., Argos P. (1983). The Structure of Bovine Rhodopsin, *Biophys. Struct. Mech.*, **9**, 235—244.
594. Harlos K., Eibl H., Pascher I., Sundell S. (1984). Conformation and Packing Properties of Phosphatidic Acid: The Crystal Structure of Monosodium Dimyristoylphosphatidate, *Chem. Phys. Lipids*, **34**, 115—126.
595. Hartl F.-U., Schmidt B., Wachter E., Weiss H., Neupert W. (1986). Transport into Mitochondria and Intramitochondrial Sorting of the Fe/S Protein of Ubiquinol-Cytochrome c Reductase, *Cell*, **47**, 939—951.
596. Hartl F.-U., Ostermann J., Guiard B., Neupert W. (1987). Successive Translocation into and out of the Mitochondrial Matrix: Targeting of Proteins to the Intermembrane Space by a Bipartite Signal Peptide, *Cell*, **51**, 1027—1037.
597. Hartsel S.C., Cafiso D.S. (1986). A Test of Discreteness-of-Charge Effects in Phospholipid Vesicles: Measurements Using Paramagnetic Amphiphiles, *Biochemistry*, **25**, 8214—8219.
598. Harwood J.L. (1987). Lung Surfactant, *Prog. Lipid Res.*, **25**, 211—256.
599. Haselbeck A., Scheckman R. (1986). Interorganelle Transfer and Glycosylation of Yeast Invertase In Vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2017—2021.
600. Hauser H. (1984). Some Aspects of the Phase Behavior of Charged Lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **772**, 37—50.
601. Hauser H., Oldani D., Phillips M.C. (1973). Mechanisms of Ion Escape from Phosphatidylcholine and Phosphatidylserine Single Bilayer Vesicles, *Biochemistry*, **12**, 4507—4517.
602. Hauser H., Shipley G.G. (1984). Interactions of Divalent Cations with Phosphatidylserine Bilayer Membranes, *Biochemistry*, **23**, 34—41.
603. Hauser H., Hazlewood G.P., Dawson R.M.C. (1985). Characterization of Membrane Lipids of a General Fatty Acid Auxotrophic Bacterium by Electron Spin Resonance Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry, *Biochemistry*, **24**, 5247—5253.
604. Hauser H., Pascher I., Pearson R.H., Sundell S. (1981). Preferred Conformation and Molecular Packing of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 21—51.
605. Hauser H., Pascher I., Sundell S. (1980). Conformation of Phospholipids: Crystal Structure of a Lysophosphatidylcholine Analogue, *J. Mol. Biol.*, **137**, 249—264.
606. Hauser H., Gains N., Muller M. (1983). Vesiculation of Unsonicated Phospholipid Dispersions Containing Phosphatidic Acid by pH Adjustment: Physicochemical Properties of the Resulting Unilamellar Vesicles, *Biochemistry*, **22**, 4775—4781.
607. Haverstick D.M., Glaser M. (1986). Visualization of Ca^{2+} -induced Phospholipid Domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4475—4479.
608. Hay B., Prusiner S.B., Lingappa V.R. (1987). Evidence for a Secretory Form of the Cellular Prion Protein, *Biochemistry*, **26**, 8110—8115.
609. Hayward S.B., Stroud R.M. (1981). Projected Structure of Purple Membrane Determined to 3.7 Å Resolution by Low Temperature Electron Microscopy, *J. Mol. Biol.*, **151**, 491—517.
610. Heacock P.N., Dowhan W. (1987). Construction of a Lethal Mutation in the Synthesis of the Major Acidic Phospholipids of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **262**, 13 044—13 049.
611. Hedrich J.L., Smith A.J. (1968). Size and Charge Isomer Separation and Estimation of Molecular Weights of Proteins by Disc Gel Electrophoresis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 155—164.
612. Helenius A., McCaslin D.R., Fries E., Tanford C. (1979). Properties of Detergents, *Methods in Enz.*, **56**, 734—749.
613. Helenius A., Simons K. (1972). The Binding of Detergents to Lipophilic and Hydrophilic Proteins, *J. Biol. Chem.*, **247**, 3656—3661.

614. *Helenius A., Simons K.* (1975). Solubilization of Membranes by Detergents, *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 29—79.
615. *Helgeson A.L., Carruthers A.* (1987). Equilibrium Ligand Binding to the Human Erythrocyte Sugar Transporter, *J. Biol. Chem.*, **262**, 5464—5475.
616. *Helmkamp G.M.* (1986). Phospholipid Transfer Proteins: Mechanism of Action, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **18**, 71—91.
617. *Helmy S., Porter-Jordan K., Dawidowicz E.A., Pilch P., Schwartz A.L., Fine R.E.* (1986). Separation of Endocytic from Exocytic Coated Vesicles Using a Novel Cholinesterase Mediated Density Shift Technique, *Cell*, **44**, 497—506.
618. *Henderson R.* (1985). Structure of a Bacterial Photosynthetic Reaction Centre, *Nature*, **318**, 598—599.
619. *Henderson R., Unwin P.N.T.* (1975). Three-dimensional Model of Purple Membrane Obtained by Electron Microscopy, *Nature (London)*, **257**, 28—32.
620. *Henderson R., Unwin P.N.T.* (1975). Three-dimensional Model of Purple Membrane Obtained by Electron Microscopy, *Nature*, **257**, 28—32.
621. *Henry G.D., Weiner J.H., Sykes B.D.* (1987). Backbone Dynamics of a Model Membrane Protein: Assignment of the Carbonyl Carbon ^{13}C NMR Resonances in Detergent-Solubilized M13 Coat Protein, *Biochemistry*, **26**, 3619—3626.
622. *Herbette L., Napolitano C.A., McDaniel R.V.* (1984). Direct Determination of the Calcium Profile Structure for Dipalmitoyllecithin Multilayers Using Neutron Diffraction, *Biophys. J.*, **46**, 677—685.
623. *Hereld D., Krakow J.L., Bangs J.D., Hart G.W., Englund P.I.* (1986). A Phospholipase C from *Trypanosoma brucei* Which Selectively Cleaves the Glycolipid on the Variant Surface Glycoprotein, *J. Biol. Chem.*, **261**, 13 813—13 819.
624. *Herskowitz I., Marsh L.* (1987). Conservation of a Receptor/Signal Transduction System, *Cell*, **50**, 995—996.
625. *Hescheler J., Rosenthal W., Trautwein W., Schultz G.* (1987). The GTP-Binding Protein, G_o , Regulates Neuronal Calcium Channels, *Nature*, **325**, 445—477.
626. *Hess J.F., Oosawa K., Matsumura P., Simon M.I.* (1987). Protein Phosphorylation Is Involved in Bacterial Chemotaxis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7609—7613.
627. *Heyn M.P.* (1979). Determination of Lipid Order Parameters and Rotational Correlation Times from Fluorescence Depolarization Experiments, *FEBS Lett.*, **108**, 359—364.
628. *Heyn M.P., Cherry R.J., Muller U.* (1977). Transient and Linear Dichroism Studies on Bacteriorhodopsin: Determination of the Orientation of the 568 nm Alltrans Retinal Chromophore, *J. Mol. Biol.*, **117**, 607—620.
629. *Hidalgo C.* (1987). Lipid-Protein Interactions and the Function of the Ca^{2+} -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **21**, 319—347.
630. *Hilditch P.H., Thomas, Rogers L.J.* (1986). Two Processes for the Breakdown of the Q_b Protein of Chloroplasts, *FEBS Lett.*, **208**, 313—317.
631. *Hilhorst R., Spruijt R., Laane C., Veeger C.* (1984). Rules for the Regulation of Enzyme Activity in Reversed Micelles as Illustrated by the Conversion of Apolar Steroids by 20 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, *Eur. J. Bioch.*, **144**, 459—466.
632. *Hill T.L.* (1977). Free Energy Transduction in Biology, Academic Press, New York.
633. *Hille B.* (1984). Ionic Channels of Excitable Membranes, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- 633a. *Hille B.* (1975). Ionic Selectivity. Saturation, and Block in Sodium Channels, *J. Gen. Physiol.*, **66**, 535—560.
634. *Hirschberg C.B., Snider M.D.* (1987). Topography of Glycosylation in the Rough Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 63—87.
635. *Hirst T.R., Holmgren J.* (1987). Conformation of Protein Secreted across Bacterial Outer Membranes: A Study of Enterotoxin Translocation from *Vibrio cholerae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7418—7422.
636. *Hitchcock P.B., Mason R., Thomas K.M., Shipley G.G.* (1974). Structural Chemistry of 1,2-Dilauroyl-DL-phosphatidylethanolamine: Molecular Conformation and Intermolecular Packing of Phospholipids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3036—3040.
637. *Hjelmeland L.M.* (1980). A Nondenaturing Zwitterionic Detergent for Membrane Biochemistry: Design and Synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 6368—6370.
638. *Hoch D.H., Romero-Mira M., Ehrlich B.E., Finkelstein A., DasGupta B.R., Simpson L.L.* (1985). Channels Formed by Botulinum, Tetanus, and Diphtheria Toxins in Planar Lipid Bilayers: Relevance to Translocation of Proteins across Membranes., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1692—1696.
639. *Hochman Y., Zakim D.* (1983). Evidence that UDP-glucuronyl-transferase in Liver Microsomes at 37°C Is in a Gel Phase Lipid Environment, *J. Biol. Chem.*, **258**, 11 758—11 762.
640. *Hochman Y., Kelley M., Zakim D.* (1983). Modulation of the Number of Ligand Binding Sites of UDP-glucuronyltransferase by the Gel to Liquid-Crystal Phase Transition of Phosphatidylcholines, *J. Biol. Chem.*, **258**, 6509—6516.
641. *Holland E.C., Drickamer K.* (1985). Signal Recognition Particle Mediates the Insertion of a Transmembrane Protein Which Has a Cytoplasmic NH_2 Terminus, *J. Biol. Chem.*, **261**, 1286—1282.
642. *Holman G.D., Rees W.D.* (1987). Photolabelling of the Hexose Transporter at External and Internal Sites: Fragmentation Patterns and Evidence for a Conformational Change, *Biochim. Biophys. Acta*, **897**, 395—405.
643. *Holt G.D., Haltiwanger R.S., Torres C.R., Hart G.W.* (1987). Erythrocytes Contain Cytoplasmic Glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14 847—14 850.
644. *Wu S.H.-W., McConnell H.M.* (1975). Phase Separations in Phospholipid Membranes, *Biochemistry*, **14**, 847—854.
645. *Honig B.N., Hubbell W.L.* (1984). Stability of "Salt Bridges" in Membrane Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5412—5416.
646. *Honig B.H., Hubbell W.L., Flewelling R.F.* (1986). Electrostatic Interactions in Membranes and Proteins, *Ann. Rev. Biophys. and Biophys. Chem.*, **15**, 163—193.
647. *Hood L., Kronenberg M., Hunkapiller T.* (1985). T Cell Antigen Receptors and the Immunoglobulin Supergene Family, *Cell*, **40**, 225—229.
648. *Hope M.J., Bally M.B., Webb G., Cullis P.R.* (1985). Production of Large Unilamellar Vesicles by a Rapid Extrusion Procedure, Characterisation of Size Distribution, Trapped Volume and Ability to Maintain a Membrane Potential, *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 55—65.
649. *Hope M.J., Bally M.B., Mayer L.D., Janoff A.S., Cullis P.R.* (1986). Generation of Multilamellar and Unilamellar Phospholipid Vesicles, *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 89—107.
650. *Hope M.J., Cullis P.R.* (1987). Lipid Asymmetry Induced by Transmembrane pH Gradients in Large Unilamellar Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **262**, 4360—4366.
651. *Hopkins C.R.* (1986). Membrane Boundaries Involved in the Uptake and Intracellular Processing of Cell Surface Receptors, *TIBS*, **11**, 473—477.
652. *Hoppe J., Gatti D., Weber H., Sebald W.* (1986). Labeling of Individual Amino Acid Residues in the Membrane-embedded F_0 Part of the F_1F_0 ATP Synthase from *Neurospora crassa*: Influence of Oligomycin and Dicyclohexylcarbodiimide, *Eur. J. Biochem.*, **155**, 259—264.
653. *Hoppe J., Brunner J., Jorgensen B.B.* (1984). Structure of the Membrane-Embedded F_0 Part of F_1F_0 ATP Synthase from *Escherichia coli* as Inferred from Labelling with 3-(trifluoromethyl)-3-(m- ^{125}I iodophenyl) diazine, *Biochemistry*, **23**, 5610—5616.

654. Hoppe J., Sebald W. (1984). The proton Conducting F₀-Part of Bacterial ATP Synthases, *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 1—27.
655. Horne W.A., Weiland G.A., Oswald R.E. (1986). Solubilization and Hydrodynamic Characterization of the Dihydropyridine Receptor from Rat Ventricular Muscle, *J. Biol. Chem.*, **261**, 3588—3594.
656. Hortsch M., Avossa D., Meyer D.I. (1985). A Structural and Functional Analysis of the Docking Protein, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9137—9145.
657. Houslay M.D. (1987). Egg Activation Unscrambles a Potential Role for IP₄, TIBS, **12**, 1—2.
658. Houslay M.D., Stamley K.K. (1982). Dynamics of Biological Membranes: Influence on Synthesis, Structure and Function, John Wiley and Sons, New York.
659. Huang C.-H. (1969). Studies on Phosphatidylcholine Vesicles. Formation and Physical Characteristics, *Biochemistry*, **8**, 344—351.
660. Huang C., Mason J.T. (1978). Geometric Packing Constraints in Egg Phosphatidylcholine Vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 308—310.
661. Huang K.-S., Wallner B.P., Mattaliano R.J., Tizard R., Burne C., Frey A., Hession C., McGray P., Sinclair L.K., Chow E.P., Browning J.L., Ramachandran K.L., Tang J., Smart J.E., Pepinsky R.B. (1986). Two Human 35 kd Inhibitors of Phospholipase A₂ Are Related to Substrates of pp60v-src and of the Epidermal Growth Factor Receptor/Kinase, *Cell*, **46**, 191—199.
662. Huang K.-S., Radhakrishnan R., Bayley H., Khorana H.G. (1982). Orientation of Retinal in Bacteriorhodopsin as Studied By Cross-linking Using a Photosensitive Analog of Retinal, *J. Biol. Chem.*, **257**, 13 616—13 623.
663. Hucho F. (1986). The Nicotinic Acetylcholine Receptor and Its Ion Channel, *Eur. J. Biochem.*, **158**, 211—226.
664. Hucho F., Oberthur W., Lottspeich F. (1986). The Ion Channel of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Is Formed by the Homologous Helices M II of the Receptor Subunits, *FEBS Lett.*, **205**, 137—141.
665. Hunkapiller T., Hood L. (1986). The Growing Immunoglobulin Gene Superfamily, *Nature*, **323**, 15—16.
666. Hunziker W., Spiess M., Semenza G., Lodish H.F. (1986). The Sucrase-Isomaltase Complex: Primary Structure, Membrane-Orientation, and Evolution of a Stalked, Intrinsic Brush Border Protein, *Cell*, **46**, 227—334.
667. Hurt E.C., Schatz G. (1987). A Cytosolic Protein Contains a Cryptic Mitochondrial Targeting Signal, *Nature*, **325**, 499—503.
668. Husebye E.S., Flatmark T. (1984). The Content of Long-Chain Free Fatty Acids and Their Effect on Energy Transduction in Chromaffin Granule Ghosts, *J. Biol. Chem.*, **259**, 15 272—15 276.
669. Husten E.J., Esmon C.T., Johnson A.E. (1987). The Active Site of Blood Coagulation Factor Xa, *J. Biol. Chem.*, **262**, 12 953—12 961.
670. Hutson J.L., Higgins J.A. (1982). Asymmetric Synthesis Followed by Transmembrane Movement of Phosphatidylethanolamine in Rat Liver Endoplasmic Reticulum, *Biochim. Biophys. Acta*, **687**, 247—256.
671. Hymel L., Maurer A., Berenski C., Jung C.Y., Fleischer S. (1984). Target Size of Calcium Pump Protein from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4890—4895.
672. Hynes R.O. (1987). Integrins: A Family of Cell Surface Receptors, *Cell*, **48**, 549—554.
673. Iacopetta B., Carpentier J.-L., Pozzan T., Lew D.P., Gorden P., Orci L. (1986). Role of Intracellular Calcium and Protein Kinase C in the Endocytosis of Transferrin and Insulin by HL60 Cells, *J. Cell Biol.*, **103**, 851—856.
674. Ichihara S., Suzuki T., Suzuki M., Mizushima S. (1986). Molecular Cloning and Sequencing of the sppA Gene and Characterization of the Encoded Protease IV, a Signal Peptide Peptidase, of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 9405—9411.
675. Ikehara Y., Hayashi Y., Ogata S., Miki A., Kominami T. (1987). Purification and Characterization of a Major Glycoprotein in Rat Hepatoma Plasma Membranes, *Biochem. J.*, **241**, 63—70.
676. Ikigai H., Nakae T. (1987). Assembly of the α -Toxin-Hexamer of *Staphylococcus aureus* in the Liposome Membrane, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2156—2160.
677. Imoto K., Methfessel C., Sakmann B., Mishina M., Mori Y., Konno T., Fukuda K., Kurasaki M., Bujo H., Fujita Y., Numa S. (1986). Location of a δ -Subunit Region Determining Ion Transport Through the Acetylcholine Receptor Channel, *Nature*, **324**, 670—674.
678. Inesi G. (1987). Sequential Mechanism of Calcium Binding and Translocation in Sarcoplasmic Reticulum Adenosine Triphosphatase, *J. Biol. Chem.*, **262**, 16 338—16 342.
679. Innis M.A., Tokunaga M., Williams M.E., Loranger J.M., Chang S.-Y., Chang S., Wu H.C. (1984). Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* Prolipoprotein Signal Peptidase (lsp) Gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3708—3712.
680. Inui K., Okano T., Takano M., Kitazawa S., Hori R. (1981). A Simple Method for the Isolation of Basolateral Plasma Membrane Vesicles from Rat Kidney Cortex, *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 150—154.
681. Ishidate K., Creeger E.S., Zrike J., Deb S., Glauner B., MacAlister T.J., Rothfield L.I. (1986). Isolation of Differentiated Membrane Domains from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Including a Fraction Containing Attachment Sites Between the Inner and Outer Membranes and the Murein Skeleton and the Cell Envelope, *J. Biol. Chem.*, **261**, 428—443.
682. Israelachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W. (1976). Theory of Self-assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, **72**, 1525—1568.
683. Israelachvili S., Marcelja S., Horn R.G. (1980). Physical Principles of Membrane Organization, *Quart. Rev. Biophys.*, **13**, 121—200.
684. Issacs B.S., Husten E.J., Esmon C.T., Johnson A.E. (1986). A Domain of Membrane-Bound Blood Coagulation Factor Va Is Located Far from the Phospholipid Surface, *Biochemistry*, **25**, 4958—4969.
685. Jackson A.P., Seow H.-F., Holmes N., Drickamer K., Parham P. (1987). Clathrin Light Chains Contain Brain-specific Insertion Sequences and a Region of Homology with Intermediate Filaments, *Nature*, **326**, 154—159.
686. Jackson B.J., Bohin J.-P., Kennedy E.P. (1984). Biosynthesis of Membrane-Derived Oligosaccharides: Characterization of mdoB Mutants Defective in Phosphoglycerol Transferase I Activity, *J. Bacteriology*, **160**, 976—981.
687. Jackson B.J., Gennity J.M., Kennedy E.P. (1986). Regulation of the Balanced Synthesis of Membrane Phospholipids: Experimental Test Models for Regulation in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 13 464—13 468.
688. Jackson C.M., Nemerson Y. (1980). Blood Coagulation, *Am. Rev. Biochem.*, **49**, 765—811.
689. Jackson M.E., Pratt J.M., Stoker N.G., Holland I.B. (1985). An Inner Membrane Protein N-Terminal Signal Sequence Is Able to Promote Efficient Localisation of an Outer Membrane Protein in *Escherichia coli*, *The EMBO Journal*, **4**, 2377—2383.
690. Jacobson K. (1983). Lateral Diffusion in Membranes, *Cell Motility*, **3**, 367—373.
691. Jacobson K., Ishihara A., Inman R. (1987). Lateral Diffusion of Proteins in Membranes, *Ann. Rev. Physiol.*, **49**, 163—175.

692. Jacobson K., O'Dell D., August J.T. (1984). Lateral Diffusion of an 80,000-dalton Glycoprotein in the Plasma Membrane of Murine Fibroblasts: Relationships to Cell Structure and Function, *J. Cell. Biol.*, **99**, 1624—1633.
693. Jain M.K. (1983). Nonrandom Lateral Organization in Bilayers and Biomembranes, *Membrane Fluidity in Biology* (R.C. Aloia, Ed.), Vol 1, pp. 1—37, Academic Press, New York.
694. Jain M.K., Zakim D. (1987). The Spontaneous Incorporation of Proteins into Preformed Bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **986**, 33—68.
695. Jain M.K., DeHaas G.H., Marecek J.F., Ramirez F. (1986). The Affinity of Phospholipase A2 for the Interface of the Substrate and Analogs, *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 475—483.
696. Jain M.K., Rogers J., Jahagirdar D.V., Marecek J.F., Ramirez F. (1986). Kinetics of Interfacial Catalysis by Phospholipase A2 in Intravesicle Scooting Mode, and Heterofusion of Anionic and Zwitterionic Vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 435—447.
697. Jain M.K., Rogers J., Marecek J.F., Ramirez F., Eibl H. (1986). Effect of the Structure of Phospholipid on the Kinetics of Intravesicle Scooting of Phospholipase A2, *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 462—474.
698. Jain M.K., Wagner R.C. (1980). *Introduction to Biological Membranes*, John Wiley and Sons, New York.
699. Jaken S., Kiley S.C. (1987). Purification and Characterization of Three Types of Protein Kinase C from Rabbit Brain Cytosol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4418—4422.
700. Janiak M.J., Small D.M., Shipley G.G. (1976). Nature of the Thermal Pretransition of Synthetic Phospholipids: Dimyristoyl- and Dipalmitoyllecithin, *Biochemistry*, **15**, 4575—4580.
701. Jans D.A., Hatch L., Fimmel A.L., Gibson F., Cox G.B. (1984). An Acidic or Basic Amino Acid at Position 26 of the β Subunit of *Escherichia coli* F_1F_0 -ATPase Impairs Membrane Proton Permeability: Suppression of the uncF469 Nonsense Mutation, *J. Bacteriology*, **160**, 764—770.
702. Jaworsky M., Mendelsohn R. (1987). Unusual Partitioning Behavior of CaATPase in Dipalmitylphosphatidylethanolamine/Dielaidoylphosphatidylcholine Mixtures, *Biophys. J.*, **52**, 241—248.
703. Jay D., Cantley L. (1986). Structural Aspects of the Red Cell Anion Exchange Protein, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 511—538.
704. Jelsema C.L., Axelrod J. (1987). Stimulation of Phospholipase A2 Activity in Bovine Rod Outer Segments by the β/γ Subunits of Transducin and Its Inhibition by the α Subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3623—3627.
705. Jenkins J.D., Madden D.P., Steck T.L. (1984). Association of Phosphofructokinase and Aldolase with the Membrane of the Intact Erythrocyte, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9374—9378.
706. Jenkins J.D., Kezdy F.J., Steck T.L. (1985). Mode of Interaction of Phosphofructokinase with the Erythrocyte Membrane, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10 426—10 433.
707. Jennings M.L., Adams-Lackey M., Denney G.H. (1984). Peptides of Human Erythrocyte Band 3 Produced by Extracellular Papain Cleavage, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4652—4660.
708. Jennings M.L., Anderson M.P., Monaghan R. (1986). Monoclonal Antibodies Against Human Erythrocyte Band 3 Protein: Localization of Proteolytic Cleavage Sites and Stilbenedisulfonate-binding Lysine Residues, *J. Biol. Chem.*, **261**, 9002—9010.
709. Jensen J.W., Schultzbach J.S. (1984). Activation of Mannosyltransferase II by Nonbilayer Phospholipids, *Biochemistry*, **23**, 1115—1119.
710. Jing S., Trowbridge I.S. (1987). Identification of the Intermolecular Disulfide Bonds of the Human Transferrin Receptor and Its Lipid-attachment Site, *The EMBO Journal*, **6**, 327—331.
711. Johnson L.M., Bankaitis V.A., Emr S.D. (1987). Distinct Sequence Determinants Direct Intracellular Sorting and Modification of a Yeast Vacuolar Protease, *Cell*, **48**, 875—885.
712. Joost H.G., Weber T.M., Cushman S.W., Simpson I.A. (1987). Activity and Phosphorylation State of Glucose Transporters in Plasma Membranes from Insulin-, Isoproterenol-, and Phorbol Ester-treated Rat Adipose Cells, *J. Biol. Chem.*, **262**, 11 261—11 267.
713. Jordan P.C. (1987). How Pore Mouth Charge Distributions Alter the Permeability of Transmembrane Ionic Channels, *Biophys. J.*, **51**, 297—311.
714. Jorgensen P.L. (1982). Mechanism of the Na^+ , K^+ Pump: Protein Structure and Conformation of the Pure $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$, *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 27—68.
715. Jubb J.S., Worcester D.L., Crespi H.L., Zaccai G. (1984). Retinal Location in Purple Membrane of *Halobacterium halobium*: A Neutron Diffraction Study of Membranes Labelled In Vivo with Deuterated Retinal, *The EMBO Journal*, **3**, 1455—1461.
716. Kaback H.R. (1986). Active Transport in *Escherichia coli*: Passage to Permease, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **15**, 279—319.
717. Kaback H.R. (1987). Use of Site-Directed Mutagenesis to Study the Mechanism of a Membrane Transport Protein, *Biochemistry*, **26**, 2071—2076.
718. Kachar B., Fuller N., Rand R.P. (1986). Morphological Responses to Calcium-Induced Interaction of Phosphatidylserine-Containing Vesicles, *Biophys. J.*, **50**, 779—788.
719. Kagawa Y. (1980). Energy Transducing Proteins in Thermophilic Biomembranes, *J. Memb. Biol.*, **55**, 1—8.
720. Kaiser C.A., Preuss D., Grisafi P., Botstein D. (1987). Many Random Sequences Functionally Replace the Secretion Signal Sequence of Yeast Invertase, *Science*, **235**, 312—317.
721. Kaiser E.T., Kezdy F.J. (1987). Peptides with Affinity for Membranes, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **16**, 561—581.
722. Kakitani T., Honig B., Crofts A.R. (1982). Theoretical Studies of the Electrochromic Response of Carotenoids in Photosynthetic Membranes, *Biophys. J.*, **39**, 57—63.
723. Kamegai J., Kimura S., Imanishi Y. (1986). Conformation of Sequential Polypeptide Poly(Leu-Leu-D-Phe-Pro) and Formation of Ion Channel Across Bilayer Lipid Membrane, *Biophys. J.*, **49**, 1101—1108.
724. Kantor H.L., Prestegard J.H. (1978). Fusion of Phosphatidylcholine Bilayer Vesicles: Role of Free Fatty Acid, *Biochemistry*, **17**, 3592—3597.
725. Kapitza H.G., Ruppel D.A., Galla H.J., Sackmann E. (1984). Lateral Diffusion of Lipids and Glycophorin in Solid Phosphatidylcholine Bilayers, *Biophys. J.*, **45**, 577—587.
726. Kapitza H.G., McGregor G., Jacobson K.A. (1985). Direct Measurement of Lateral Transport in Membranes by Using Time-resolved Spatial Photometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4122—4126.
727. Karin N.J., Cook J.S. (1986). Turnover of the Catalytic Subunit of Na, K-ATPase in HTC Cells, *J. Biol. Chem.*, **261**, 10 422—10 428.
728. Karnovsky M.J., Kleinfeld R.L., Hoover R.L., Klausner R.D. (1982). The Concept of Lipid Domains in Membranes, *J. Cell Biol.*, **94**, 1—6.
729. Kasianowicz J., Benz R., McLaughlin S. (1984). The Kinetic Mechanism by which CCCP (Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone) Transports Protons across Membranes, *J. Membrane Biol.*, **82**, 179—190.
730. Kasianowicz J., Benz R., McLaughlin S. (1987). How Do Protons Cross the Membrane-Solution Interface? Kinetic Studies on Bilayer Membranes Exposed to the Protonophore S-13 (5-chloro-3-tert-butyl-2'-chloro-4' nitrosalicylanilide), *J. Memb. Biol.*, **95**, 73—89.
731. Katre N.V., Finer-Moore J., Stroud R.M., Hayward S.B. (1984). Location of an Extrinsic Label in the Primary and Tertiary Structure of Bacteriorhodopsin, *Biophys. J.*, **46**, 195—204.
732. Kaufman J.F., Auffray C., Korman A.J., Shackelford D.A., Strominger J. (1984). The

- Class II Molecules of the Human and Murine Major Histocompatibility Complex, *Cell*, **36**, 1—13.
733. Kawakami K., Noguchi S., Noda M., Takahashi H., Ohta T., Kawamura M., Nojima H., Nagano K., Hirose T., Inayana S., Hayashida H., Miyata T., Numa S. (1985). Primary Structure of the α -Subunit of Torpedo californica ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase Deduced from cDNA Sequence, *Nature*, **316**, 733—736.
 734. Kawakami K., Ohta T., Nojima H., Nagano K. (1986). Primary Structure of the α -Subunit of Human Na, K-ATPase Deduced from cDNA Sequence, *J. Biochem.*, **100**, 389—397.
 735. Kawashima Y., Bell R.M. (1987). Assembly of the Endoplasmic Reticulum Phospholipid Bilayer, *J. Biol. Chem.*, **262**, 16 495—16 502.
 736. Kawato S., Sigel E., Carafoli E., Cherry R.J. (1981). Rotation of Cytochrome Oxidase in Phospholipid Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **256**, 7518—7527.
 737. Kleffel B., Garavito R.M., Baumeister W., Rosenbusch J.P. (1985). Secondary Structure of a Channel Forming Protein: Porin from *E. coli* Outer Membranes, *The EMBO Journal*, **4**, 1589—1592.
 738. Kelly R.B. (1985). Pathways of Protein Secretion in Eukaryotes, *Science*, **230**, 25—32.
 739. Kelusky E.C., Smith I.C.P. (1983). Characterization of the Binding of the Local Anesthetics Procaine and Tetracaine to Model Membranes of Phosphatidylethanolamine: A Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Study, *Biochemistry*, **22**, 6011—6017.
 740. Kempf C., Klausner R.D., Weinstein J.N., Van Renswonde J., Pincus M., Blumenthal J. (1982). Voltage-dependent Trans-bilayer Orientation of Melittin, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2469—2476.
 741. Kempner E.S., Haigler H.T. (1985). Target Analysis of Growth Factor Receptors, Growth and Maturation Factors (G. Guroff, Ed.), Vol. 3, pp. 149—173, John Wiley, New York.
 742. Kempner E.S., Schlegel W. (1979). Size Determination of Enzymes by Radiation Inactivation, *Anal. Biochem.*, **92**, 2—10.
 743. Kensil C.R., Strittmatter P. (1986). Binding and Fluorescence Properties of the Membrane Domain of NADH-Cytochrome-b₅ Reductase: Determination of the Depth of Trp-16 in the Bilayer, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7316—7321.
 744. Kerrick W.G.L., Bourguignon Y.W. (1984). Regulation of Receptor Capping in Mouse Lymphoma T Cells by Ca^{2+} -Activated Myosin Light Chain Kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 165—169.
 745. Khorana H.G., Gerber G.E., Herlihy W.C., Gray C.P., Anderegg R.J., Nihei K., Biemann K. (1979). Amino Acid Sequence of Bacteriorhodopsin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5046—5050.
 746. Kielian M.C., Marsh M., Helenius A. (1986). Kinetics of Endosome Acidification Detected by Mutant and Wild-type Semliki Forest Virus, *The EMBO Journal*, **5**, 3103—3109.
 747. Kikutani H., Inui S., Sato R., Barsumian E.L., Owaki H., Yamasaki K., Kaisho T., Uchibayashi N., Hardy R.R., Hirano T., Tsunasawa S., Sakiyama F., Suemura M., Kishimoto T. (1986). Molecular Structure of Human Lymphocyte Receptor for Immunoglobulin E, *Cell*, **47**, 657—665.
 748. Killian J.A., Verkleij A.J., Leunissen-Bijvelt J., de Kruijff B. (1985). External Addition of Gramicidin Induces H_{II} Phase in Dioleoylphosphatidylcholine Model Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 21—26.
 749. Killian J.A., de Kruijff B. (1985). Importance of Hydration for Gramicidin-Induced Hexagonal H_{II} Phase Formation in Dioleoylphosphatidylcholine Model Membranes, *Biochemistry*, **24**, 7890—7898.
 750. Kim J., Kim H. (1986). Fusion of Phospholipid Vesicles Induced by α -Lactalbumin at Acidic pH, *Biochemistry*, **25**, 7867—7874.
 751. Kim K.S., Vercauteren D.P., Welte M., Chin S., Clementi E. (1985). Interaction of K^+ Ion with the Solvated Gramicidin A Transmembrane Channel, *Biophys. J.*, **47**, 327—335.
 752. Kimelberg H.K., Papahadjopoulos D. (1972). Phospholipid Requirements for ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase Activity: Head-Group Specificity and Fatty Acid Fluidity, *Biochim. Biophys. Acta*, **282**, 277—292.
 753. Kimura K., Mason T.L., Khorana H.G. (1982). Immunological Probes for Bacteriorhodopsin: Identification of Three Distinct Antigenic Sites on the Cytoplasmic Surface, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2859—2867.
 754. Kinet J.-P., Metzger H., Hakimi J., Kochan J. (1987). A cDNA Presumptively Coding for the α Subunit of the Receptor with High Affinity for Immunoglobulin E, *Biochemistry*, **26**, 4605—4610.
 755. King G.I., Jacobs R.E., White S.H. (1985). Hexane Dissolved in Dioleoyllecithin Bilayers Has a Partial Molar Volume of Approximately Zero, *Biochemistry*, **24**, 4637—4645.
 756. King G.I., Stoeckenius W., Crespi H.L., Schoenborn B.P. (1979). The Location of Retinal in the Purple Membrane Profile by Neutron Diffraction, *J. Mol. Biol.*, **130**, 395—404.
 757. Kinoshita K., Kawato S., Ikegami A. (1977). A Theory of Fluorescence Polarization Decay in Membranes, *Biophys. J.*, **20**, 289—305.
 758. Kirchhausen T., Scarmato P., Harrison S.C., Monroe J.J., Chow E.P., Mattaliano R.J., Ramachandran K.L., Smart J.E., Ahn A.H., Brosius J. (1987). Clathrin Light Chains LCA and LCB Are Similar, Polymorphic, and Share Repeated Heptad Motifs, *Science*, **236**, 320—324.
 759. Kishimoto T.K., O'Connor K., Lee A., Roberts T.M., Springer T.A. (1987). Cloning of the β Subunit of the Leukocyte Adhesion Proteins: Homology to an Extracellular Matrix Receptor Defines a Novel Supergene Family, *Cell*, **48**, 681—690.
 760. Kistler J., Stroud R.M. (1981). Crystalline Arrays of Membrane-bound Acetylcholine Receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3678—3682.
 761. Kleene R., Pfanner N., Pfaller R., Link T.A., Sebald W., Neupert W., Tropschug M. (1987). Mitochondrial Porin of *Neurospora crassa*: cDNA Cloning, In Vitro Expression and Import into Mitochondria, *The EMBO Journal*, **6**, 2627—2634.
 762. Kleinberg M.E., Finkelstein A. (1984). Single-Length and Double-Length Channels Formed by Nystatin in Lipid Bilayer Membranes, *J. Membrane Biol.*, **80**, 257—269.
 763. Klingenberg M. (1981). Membrane Protein Oligomeric Structure and Transport Function, *Nature*, **290**, 449—453.
 764. Klionsky D.J., Brusilow W.S.A., Simoni R.D. (1984). In Vivo Evidence for the Role of the Epsilon Subunit as an Inhibitor of the Proton-Translocating ATPase of *Escherichia coli*, *J. Bacteriology*, **160**, 1055—1060.
 765. Knoll W., Schmidt G., Ibel K., Sackmann E. (1985). Small-Angle Neutron Scattering Study of Lateral Phase Separation in Dimyristoylphosphatidylcholine-Cholesterol Mixed Membranes, *Biochemistry*, **24**, 5240—5246.
 766. Knowles P.F., Watts A., Marsh D. (1979). Spin-Label Studies of Lipid Immobilization in Dimyristoylphosphatidylcholine-Substituted Cytochrome Oxidase, *Biochemistry*, **18**, 4480—4487.
 767. Koblika B.K., Matsui H., Koblika T.S., Yang-Feng T.L., Francke U., Caron M.G., Leftkowitz R.J., Regan J.W. (1987). Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Coding for the Human Platelet α_2 -Adrenergic Receptor, *Science*, **238**, 650—656.
 768. Kochevar D.T., Anderson R.G.W. (1987). Purified Crystalline Endoplasmic Reticulum from UT-1 Cells Contains Multiple Proteins in Addition to 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase, *J. Biol. Chem.*, **262**, 10 321—10 326.
 769. Kodaki T., Yamashita S. (1987). Yeast Phosphatidylethanolamine Methylation Pathway, *J. Biol. Chem.*, **262**, 15 428—15 435.

770. Koland J.G., Miller M.J., Gennis R.B. (1984). Reconstitution of the Membrane-Bound, Ubiquinone-Dependent Pyruvate Oxidase Respiratory Chain of *E. coli* with the Cytochrome d Terminal Oxidase, *Biochemistry*, 445—453.
771. Kominami S., Hara H., Ogishima T., Takemori S. (1984). Interaction between Cytochrome P-450 (P-450c21) and NADPH-Cytochrome P-450 Reductase from Adrenocortical Microsomes in a Reconstituted System, *J. Biol. Chem.*, 259, 2991—2999.
772. Kominami S., Iton Y., Takemori S. (1986). Studies on the Interaction of Steroid Substrates with Adrenal Microsomal Cytochrome P-450 (P-450c21) in Liposome Membranes, *J. Biol. Chem.*, 261, 2077—2083.
773. Kop J.M.M., Cuypers P.A., Lindhout T., Hemker H.C., Hermens W.T. (1984). The Adsorption of Prothrombin to Phospholipid Monolayers Quantitated by Ellipsometry, *J. Biol. Chem.*, 259, 13 993—13 998.
774. Kopito R.R., Lodish H.F. (1985). Primary Structure and Transmembrane Orientation of the Murine Anion Exchange Protein, *Nature*, 316, 234—238.
775. Kopito R.R., Lodish H.F. (1985). Structure of the Murine Anion Exchange Protein, *J. Cell Biochem.*, 29, Y—17.
776. Kordossi A.A., Tzartos S.J. (1987). Conformation of Cytoplasmic Segments of Acetylcholine Receptor α - and β -Subunits Probed by Monoclonal Antibodies: Sensitivity of the Antibody Competition Approach, *The EMBO Journal*, 6, 1605—1610.
777. Kornacki J.A., Firshein W. (1986). Replication of Plasmid RK2 In Vitro by a DNA-Membrane Complex: Evidence for Initiation of Replication and Its Coupling to Transcription and Translation, *J. Bacteriology*, 167, 319—326.
778. Kornfeld S. (1987). Trafficking of Lysosomal Enzymes, *FASEB J.*, 1, 462—468.
779. Korsgren C., Cohen C.M. (1986). Purification and Properties of Human Erythrocyte Band 4.2: Association with the Cytoplasmic Domain of Band 3, *J. Biol. Chem.*, 261, 5536—5543.
780. Kosower E.M. (1985). A Structural and Dynamic Molecular Model for the Sodium Channel of *Electrophorus electricus*, *FEBS Lett.*, 182, 234—242.
781. Kouyama T., Kouyama A.N., Ikegami A. (1987). Bacteriorhodopsin Is a Powerful Light-driven Proton Pump, *Biophys. J.*, 51, 839—841.
782. Krab K., van Walraven H.S., Scholts M.J.C., Kraayenhof R. (1985). Measurement of Diffusion Potentials in Liposomes. Origin and Properties of the Threshold Level in the Oxonol VI Response, *Biochim. Biophys. Acta*, 809, 228—235.
783. Krbecek R., Gebhardt C., Gruler H., Sackmann E. (1979). Three Dimensional Microscopic Surface Profiles of Membranes Reconstituted from Freeze-Etching Electron Micrographs, *Biochim. Biophys. Acta*, 554, 1—22.
784. Krebs K.E., Phillips M.C. (1983). The Helical Hydrophobic Moments and Surface Activities of Serum Apolipoproteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 754, 227—230.
785. Kreis T.E., Lodish H.F. (1986). Oligomerization Is Essential for Transport of Vesicular Stomatitis Viral Glycoprotein to the Cell Surface, *Cell*, 46, 929—937.
786. Kreutter D., Kim J.Y.H., Goldenring J.R., Rasmussen H., Ukomadu C., DeLorenzo R.J., Yu R.K. (1987). Regulation of Protein Kinase C Activity by Gangliosides, *J. Biol. Chem.*, 262, 1633—1637.
787. Krieg U.C., Issacs B.S., Yemul S.S., Esmon C.T., Bayley H., Johnson A.E. (1987). Interaction of Blood Coagulation Factor Va with Phospholipid Vesicles Examined by Using Lipophilic Photoreagents, *Biochemistry*, 26, 103—109.
788. Krikos A., Conley M.P., Boyd A., Berg H.C., Simon M.I. (1985). Chimeric Chemosensory Transducers of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1326—1330.
789. Krishnamoorthy G., Hinkle P.C. (1984). Non-Ohmic Proton Conductance of Mitochondria and Liposomes, *Biochemistry*, 23, 1640—1645.
790. Krupka R.M. (1985). Asymmetrical Binding of Phloretin to the Glucose Transport System of Human Erythrocytes, *J. Membrane Biol.*, 83, 71—80.
791. Krupka R.M., Deves R. (1983). Kinetics of Inhibition of Transport Systems, *Int. Rev. of Cyt.*, 84, 303—352.
792. Kubesch P., Boggs J., Luciano L., Maass G., Tummler B. (1987). Interaction of Polymyxin B Nonapeptide with Anionic Phospholipids, *Biochemistry*, 26, 2139—2149.
793. Kubo T., Fukuda K., Mikami A., Maeda A., Takahashi H., Mishina M., Haga T., Haga K., Ichijima A., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S. (1986). Cloning, Sequencing and Expression of Complementary DNA Encoding the Muscarinic Acetylcholine Receptor, *Nature*, 323, 411—416.
794. Kuge O., Nishijima M., Akamatsu Y. (1986). Phosphatidylserine Biosynthesis in Cultured Chinese Hamster Ovary Cells: Genetic Evidence for Utilization of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine as Precursors, *J. Biol. Chem.*, 261, 5795—5798.
795. Kuhlbrandt W. (1984). Three-dimensional Structure of the Light Harvesting Chlorophyll a/b-Protein Complex, *Nature*, 307, 478—480.
796. Kuhn A. (1987). Bacteriophage M13 Procoat Protein Inserts into the Plasma Membrane as a Loop Structure, *Science*, 238, 1413—1415.
797. Kuhn A., Kreil G., Wickner W. (1986). Both Hydrophobic Domains of M13 Procoat Are Required to Initiate Membrane Insertion, *The EMBO Journal*, 5, 3681—3685.
798. Kuhn A., Wickner W., Kreil G. (1986). The Cytoplasmic Carboxy Terminus of M13 Procoat Is Required for the Membrane Insertion of Its Central Domain, *Nature*, 322, 335—339.
799. Kuhn L.A., Leigh J.S. (1985). A Statistical Technique for Predicting Membrane Protein Structure, *Biochim. Biophys. Acta*, 828, 351—361.
800. Kumamoto C.A., Simoni R.D. (1986). Genetic Evidence for Interaction between the a and b Subunits of the F_0 Portion of the *Escherichia coli* Proton Translocating ATPase, *J. Biol. Chem.*, 261, 10 037—10 042.
801. Kumamoto C.A., Simoni R.D. (1987). A Mutation of the c Subunit of the *Escherichia coli* Proton-translocating ATPase That Suppresses the Effects of a Mutant b Subunit, *J. Biol. Chem.*, 262, 3060—3064.
802. Kumar A., Gupta C.M. (1985). Transbilayer Phosphatidylcholine Distribution in Small Unilamellar Sphingomyelin-phosphatidylcholine Vesicles: Effect of Altered Polar Head Group, *Biochemistry*, 24, 5157—5163.
803. Kusano T., Steinmetz D., Hendrickson W.G., Murchie J., King M., Benson A., Schaechter M. (1984). Direct Evidence for Specific Binding of the Replicative Origin of the *Escherichia coli* Chromosome to the Membrane, *J. Bacteriology*, 158, 313—316.
804. Kyte J., Doolittle R.F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein, *J. Mol. Biol.*, 157, 105—132.
805. Labarca P., Montal M.S., Lindstrom J.M., Montal M. (1985). The Occurrence of Long Openings in the Purified Cholinergic Receptor Channel Increases with Acetylcholine Concentration, *The Journal of Neuroscience*, 5, 3409—3413.
806. Labischinski H., Barnickel G., Bradaczek H., Naumann D., Riethel E.T., Giesbrecht P. (1985). High State of Order of Isolated Bacterial Lipopolysaccharide and Its Possible Contribution to the Permeation Barrier Property of the Outer Membrane, *J. Bacteriology*, 162, 9—20.
807. Laffan J., Fischein W. (1987). DNA Replication by a DNA-Membrane Complex Extracted from *Bacillus subtilis*: Site of Initiation In Vitro and Initiation Potential of Subcomplexes, *J. Bacteriology*, 169, 2819—2827.
808. Lagaly G., Weiss A., Stuke E. (1977). Effect of Double-Bonds on Bimolecular Films in Membrane Models, *Biochim. Biophys. Acta*, 470, 331—341.

809. Lai C.-S., Schutzbach J.S. (1986). Localization of Dolichols in Phospholipid Membranes, *FEBS Lett.*, **203**, 153—156.
810. Lai C., Brow M.A., Nave K.-A., Noronna A.B., Quarles R.H., Bloom F.E., Milner R.J., Sutcliffe J.G. (1987). Two Forms of IB236/Myelin-associated Glycoprotein, a Cell Adhesion Molecule for Postnatal Neural Development, Are Produced by Alternative Splicing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4337—4341.
811. Lai J.-S., Sarvas M., Brammar W.J., Neugebauer K., Wu H.C. (1981). *Bacillus licheniformis* Penicillinase Synthesized in *E. coli* Contains Covalently Linked Fatty Acid and Glyceride, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3506—3510.
812. Laitinen J., Loppinen R., Merenmies J., Rauvala H. (1987). Binding of Laminin to Brain Gangliosides and Inhibition of Laminin-Neuron Interaction by the Gangliosides, *FEBS Lett.*, **217**, 94—100.
813. Lakey J.H. (1987). Voltage Gating in Porin Channels, *FEBS Lett.*, **211**, 1—4.
814. Lambeth J.D., Seybert D.W., Kamin H. (1980). Phospholipid Vesicle-reconstituted Cytochrome P-450_{sc}: Mutually Facilitated Binding of Cholesterol and Adrenodoxin, *J. Biol. Chem.*, **255**, 138—143.
815. Lambeth J.D., Geren L.M., Millett F. (1984). Adrenodoxin Interaction with Adrenodoxin Reductase and Cytochrome P-450_{sc}: Cross-linking of Protein Complexes and Effects of Adrenodoxin Modification by 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimide, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10 025—10 029.
816. Lambeth J.D., Pember S.O. (1983). Cytochrome P-450_{sc}-Adrenodoxin Complex, *J. Biol. Chem.*, **258**, 5596—5602.
817. Lambrecht B., Schmidt M.F.G. (1986). Membrane Fusion Induced by Influenza Virus Hemagglutinin Requires Protein Bound Fatty Acids, *FEBS Lett.*, **202**, 127—132.
818. Lampe P.D., Pusey M.L., Wei G.L., Nelsestuen G.L. (1984). Electron Microscopy and Hydrodynamic Properties of Blood Clotting Factor V and Activation Fragments of Factor V with Phospholipid Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9959—9964.
819. Lanyi J.K. (1986). Halorhodopsin: A Light-driven Chloride Ion Pump, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **15**, 11—28.
820. Lapetina E.G., Watson S.P., Cuatrecasas P. (1984). myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate Stimulates Protein Phosphorylation in Saponin-permeabilized Human Platelets, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7431—7435.
821. Lau S.H., Rivier J., Vale W., Kaiser E.T., Kezdy F.J. (1983). Surface Properties of an Amphiphilic Peptide Hormone and of Its Analog: Corticotropin-releasing Factor and Sauvagine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7070—7074.
822. Laubinger W., Dimroth P. (1987). Characterization of the Na⁺-stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an Enzyme of the F₁F₀ Type, *Eur. J. Biochem.*, **168**, 475—480.
823. Lauffer L., Garcia P.D., Harkins R.N., Coussens L., Ullrich A., Walter P. (1985). Topology of Signal Recognition Particle Receptor in Endoplasmic Reticulum Membrane, *Nature*, **318**, 334—338.
824. Lauger P. (1973). Ion Transport through Pores: A Rate Theory Analysis, *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 423—441.
825. Lauger P. (1984). Thermodynamic and Kinetic Properties of Electrogenic Ion Pumps, *Biochim. Biophys. Acta*, **779**, 307—341.
826. Laursen R.A., Samiullah M., Lees M.B. (1984). The Structure of Bovine Brain Myelin Proteolipid and Its Organization in Myelin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2912—2916.
827. Leconte M.-F., Krishnaswamy S., Mann K.G., Nesheim M.E., Giller C. (1987). Membrane Penetration of Bovine Factor V and Va Detected by Labelling with 5-Iodonaphthalene-1-Azide, *J. Biol. Chem.*, **262**, 1935—1937.
828. Lee A.G. (1987). Interactions of Lipids and Proteins: Some General Principles, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **19**, 581—603.
829. Lee A.G. (1983). Lipid Phase Transitions and Mixtures, *Membrane Fluidity in Biology* (R.C. Aloia, Ed.), Vol. 2, pp. 43—88, Academic Press, New York.
830. Lee A.G. (1978). Calculation of Phase Diagrams for Non-Ideal Mixtures of Lipids, and a Possible Non-Random Distribution of Lipids in Lipid Mixtures in the Lipid Crystalline Phase, *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 433—444.
831. Lee D.C., Durrani A.A., Chapman D. (1984). A Difference Infrared Spectroscopic Study of Gramicidin A, Alamethicin, and Bacteriorhodopsin in Perdeuterated Dimyristoylphosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 49—56.
832. Lee D.C., Hayward J.A., Restall C.J., Chapman D. (1985). Second-derivative Infrared Spectroscopic Studies of the Secondary Structures of Bacteriorhodopsin and Ca²⁺-ATPase, *Biochemistry*, **24**, 4364—4373.
833. Lehrman M.A., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D.W., Schneider W.J. (1985). Internalization-Defective LDL Receptors Produced by Genes with Nonsense and Frameshift Mutations That Truncate the Cytoplasmic Domain, *Cell*, **41**, 735—743.
834. Lemansky P., Hasilik A., von Figura K., Helmy S., Fishman J., Fine R.E., Kedersha N.L., Rome L.H. (1987). Lysosomal Enzyme Precursors in Coated Vesicles Derived from the Exocytic and Endocytic Pathways, *J. Cell Biol.*, **104**, 1743—1748.
835. Lemmon S.K., Jones E.W. (1987). Clathrin Requirement for Normal Growth of Yeast, *Science*, **238**, 504—509.
836. Lenard J., Singer S.J. (1966). Protein Conformation in Cell Membrane Preparations as Studied by Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 1828—1835.
837. Lenaz G., Fato R. (1986). Is Ubiquinone Diffusion Rate Limiting for Electron Transfer? *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **18**, 369—401.
838. Lemke H.-D., Oesterhelt D. (1981). Lysine 216 Is a Binding Site of the Retinyl Moiety in Bacteriorhodopsin, *FEBS Lett.*, **128**, 255—260.
839. Lentz B.R., Barrow D.A., Hoehli M. (1980). Cholesterol-Phosphatidylcholine Interactions in Multilamellar Vesicles, *Biochemistry*, **19**, 1943—1954.
840. Lentz B.R., Clubb K.W., Alford D.R., Hochli M., Meissner G. (1985). Phase Behavior of Membranes Reconstituted from Dipentadecanoyl Phosphatidylcholine and the Mg²⁺-Dependent, Ca²⁺-Stimulated Adenosinetriphosphatase of Sarcoplasmic Reticulum: Evidence for a Disrupted Lipid Domain Surrounding Protein, *Biochemistry*, **24**, 433—442.
841. Lentz B.R., Barenholz Y., Thompson T.E. (1976). Fluorescence Depolarization Studies of Phase Transitions and Fluidity in Phospholipid Bilayers 2. Two Component Phosphatidylcholine Liposomes, *Biochemistry*, **15**, 4529—4537.
842. Leo G.C., Colnago L.A., Valentine K.G., Opella S.J. (1987). Dynamics of fd Coat Protein in Lipid Bilayers, *Biochemistry*, **26**, 854—862.
843. Leonard K., Wingfield P., Arad T., Weiss H. (1981). Three-dimensional Structure of Ubiquinol: Cytochrome c Reductase from *Neurospora* Mitochondria Determined by Electron Microscopy of Membrane Crystals, *J. Mol. Biol.*, **149**, 259—274.
844. Leung J.O., Holland E.C., Drickamer K. (1985). Characterization of the Gene Encoding the Major Rat Liver Asialoglycoprotein Receptor, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12 523—12 527.
845. Leventis R., Gagne J., Fuller N., Rand R.P., Silvius J.R. (1986). Divalent Cation Induced Fusion and Lipid Lateral Segregation in Phosphatidylcholine-Phosphatidic Acid Vesicles, *Biochemistry*, **25**, 6978—6987.
846. Levitt D.G. (1986). Interpretation of Biological Ion Channel Flux Data—Reaction-Rate versus Continuum Theory, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **15**, 29—57.

847. *Levitzki A.* (1985). Reconstitution of Membrane Receptor Systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 127—153.
848. *Lewis B.A., Engelman D.M.* (1983). Lipid Bilayer Thickness Varies Linearly with Acyl Chain Length in Fluid Phosphatidylcholine Vesicles, *J. Mol. Biol.*, **166**, 211—217.
849. *Lewis B.A., Gray G.M., Coleman R., Michell R.H.* (1975). Differences in the Enzymic, Polypeptide, Glycopeptide, Glycolipid, and Phospholipid Compositions of Plasma Membranes from the Two Surfaces of Intestinal Epithelial Cells, *Bioch. Soc. Trans.*, **3**, 752—753.
850. *Lewis B.A., Harbison G.S., Herzfeld J., Griffin R.C.* (1985). NMR Structural Analysis of a Membrane Protein: Bacteriorhodopsin Peptide Backbone Orientation and Motion, *Biochemistry*, **24**, 4671—4679.
851. *Lewis B.A., Engelman P.M.* (1983). Bacteriorhodopsin Remains Dispersed in Fluid Phospholipid Bilayers Over a Wide Range of Bilayer Thickness, *J. Mol. Biol.*, **166**, 203—210.
852. *Lewis C.A., Stevens C.F.* (1983). Acetylcholine Receptor Channel Ionic Selectivity: Ions Experience an Aqueous Environment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6110—6113.
853. *Liao M.-J., Khorana H.G.* (1984). Removal of the Carboxyl-terminal Peptide Does Not Affect Refolding or Function of Bacteriorhodopsin as a Light-dependent Proton Pump, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4194—4199.
854. *Lichtenberg D., Romero G., Menashe M., Biltonen R.L.* (1986). Hydrolysis of Dipalmitoylphosphatidylcholine Large Unilamellar Vesicles by Porcine Pancreatic Phospholipase A2, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5334—5340.
855. *Lichtenberg D., Menashe M., Donaldson S., Biltonen R.L.* (1984). Thermodynamic Characterization of the Pretransition of Unilamellar Dipalmitoylphosphatidylcholine Vesicles, *Lipids*, **19**, 395—400.
856. *Lieb W.R., Stein W.D.* (1986). Non-Stokesian Nature of Transverse Diffusion within Human Red Cell Membranes, *J. Membrane Biol.*, **92**, 111—119.
857. *Lieber M.R., Steck T.L.* (1982). Dynamics of the Holes in Human Erythrocyte Membrane Ghosts, *J. Biol. Chem.*, **257**, 11 660—11 666.
858. *Lieber M.R., Lange Y., Weinstein R.S., Steck T.L.* (1984). Interaction of Chlorpromazine with the Human Erythrocyte Membrane, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9225—9234.
859. *Lill H., Engelbrecht S., Schonknecht G., Junge W.* (1986). The Proton Channel, CF₀ in Thylakoid Membranes: Only a Low Proportion of CF₁-lacking CF₀ Is Active with a High Unit Conductance (169 fS), *J. Biochem.*, **160**, 627—634.
860. *Lindberg F., Lund B., Johansson L., Normark S.* (1987). Localization of the Receptor-Binding Protein Adhesin at the Tip of the Bacterial Pilus, *Nature*, **328**, 84—87.
861. *Lipp J., Dobberstein B.* (1986). The Membrane-Spanning Segment of Invariant Chain (I γ) Contains a Potentially Cleavable Signal Sequence, *Cell*, **46**, 1103—1112.
862. *Lipp J., Dobberstein B.* (1986). Signal Recognition Particle-dependent Membrane Insertion of Mouse Invariant Chain: A Membrane-spanning Protein with a Cytoplasmically Exposed Amino Terminus, *J. Cell Biol.*, **102**, 2169—2175.
863. *Lippincott-Schwartz J., Fambrough D.M.* (1987). Cycling of the Integral Membrane Glycoprotein LEP100, between Plasma Membrane and Lysosomes: Kinetic and Morphological Analysis, *Cell*, **49**, 669—677.
864. *Liss L.R., Oliver D.B.* (1986). Effects of secA Mutations on the Synthesis and Secretion of Proteins in *Escherichia coli*: Evidence for a Major Export System for Cell Envelope Proteins, *J. Biol. Chem.*, **261**, 2299—2303.
865. *Liu S.-C., Derick L.H., Palek J.* (1987). Visualization of the Hexagonal Lattice in the Erythrocyte Membrane Skeleton, *J. Cell Biol.*, **104**, 527—536.
866. *Livneh E., Benveniste M., Prywes R., Felder S., Kam Z., Schlessinger J.* (1987). Large Deletions in the Cytoplasmic Kinase Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor Do Not Affect Its Lateral Mobility, *J. Cell Biol.*, **103**, 327—331.
867. *Livneh E., Reiss N., Berent E., Ullrich A., Schlessinger J.* (1987). An Insertional Mutant of Epidermal Growth Factor Receptor Allows Dissection of Diverse Receptor Functions, *The EMBO Journal*, **6**, 2669—2676.
868. *Livneh E., Prywes R., Kashles O., Reiss N., Sasson I., Mory Y., Ullrich A., Schlessinger J.* (1986). Reconstitution of Human Epidermal Growth Factor Receptor and Its Deletion Mutants in Cultured Hamster Cells, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12 490—12 497.
869. *Lobel P., Dahms N.M., Breitmeyer J., Chirgwin J.M., Kornfeld S.* (1987). Cloning of the Bovine 215-kDa Cation-independent Mannose 6-phosphate Receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2233—2237.
870. *Loeb J.A., Drickamer K.* (1987). The Chicken Receptor for Endocytosis of Glycoproteins Contains a Cluster of N-Acetylglucosamine-binding Sites, *J. Biol. Chem.*, **262**, 3022—3029.
871. *Loewenstein W.R.* (1987). The Cell-to-Cell Channel of Gap Junctions, *Cell*, **48**, 725—726.
872. *London E., Feigenson G.W.* (1981). Fluorescence Quenching in Model Membranes 2 Determination of the Local Lipid Environment of the Calcium Adenosine-triphosphatase from Sarcoplasmic Reticulum, *Biochemistry*, **20**, 1939—1948.
873. *Lorenzina-Fiallo M.M., Garnier-Suillerot A.* (1986). Interaction of Adriamycin with Cardiolipin-containing Vesicles. Evidence of an Embedded Site for the Dihydroanthraquinone Moiety, *Biochim. Biophys. Acta*, **854**, 143—146.
874. *Louie K., Chen Y.-C., Dowhan W.* (1986). Substrate-Induced Membrane Association of Phosphatidylserine Synthase from *Escherichia coli*, *J. Bacteriology*, **165**, 805—812.
875. *Low M.G.* (1987). Biochemistry of the Glycosyl-phosphatidylinositol Membrane Protein Anchors, *Biochem. J.*, **244**, 1—13.
876. *Low P.S.* (1986). Structure and Function of the Cytoplasmic Domain of Band 3: Center of Erythrocyte Membrane-Peripheral Protein Interactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 145—167.
877. *Lu P.-W., Soong C.-J., Tao M.* (1985). Phosphorylation of Ankyrin Decreases Its Affinity for Spectrin Tetramer, *J. Biol. Chem.*, **260**, 14 958—14 964.
878. *Lubben T.H., Bansberg J., Keegstra K.* (1987). Stop-Transfer Regions Do Not Halt Translocation of Proteins into Chloroplasts, *Science*, **238**, 1112—1114.
879. *Lucy J.A.* (1984). Do Hydrophobic Sequences Cleaved from Cellular Polypeptides Induce Membrane Fusion Reactions In Vivo? *FEBS Lett.*, **166**, 223—231.
880. *Lucy J.A., Glauert A.M.* (1964). Structure and Assembly of Macromolecular Lipid Complexes Composed of Globular Micelles, *J. Mol. Biol.*, **8**, 727—748.
881. *Lucy J.A., Ahkong Q.F.* (1986). An Osmotic Model for the Fusion of Biological Membranes, *FEBS Lett.*, **199**, 1—11.
882. *Luderitz O., Freudenberg M.A., Galanos C., Lehmann V., Rietschel E.T., Shaw D.H.* (1982). Lipopolysaccharides of Gram Negative Bacteria, *Current Topics in Membranes and Transport*, **17**, 79—151.
883. *Ludwig D.S., Ribic H.O., Schoolnik G.K., Kornberg R.D.* (1986). Two-dimensional Crystals of Cholera Toxin B-subunit-receptor Complexes: Projected Structure at 17-Å Resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8585—8588.
884. *Ludwig O., De Pinto V., Palmieri F., Benz R.* (1986). Pore Formation by the Mitochondrial Porin of Rat Brain in Lipid Bilayer Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 268—276.
885. *Lugtenberg B., Van Alphen L.* (1983). Molecular Architecture and Functioning of the Outer Membrane of *Escherichia coli* and Other Gram-negative Bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 51—115.

886. *Luxnat M., Galla H.-J.* (1986). Partition of Chlorpromazine into Lipid Bilayer Membranes: The Effect of Membrane Structure and Composition, *Biochim. Biophys. Acta*, **856**, 274—282.
887. *Luzikov V.N.* (1986). Proteolytic Control Over Topogenesis of Membrane Proteins, *FEBS Lett.*, **200**, 259—264.
888. *Luzzati V., DeRosz M., Gulik A., Gambacorta A.* (1987). Polar Lipids of Thermophilic Prokaryotic Organisms: Chemical and Physical Structure, *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **16**, 25—47.
889. *Mabrey S., Sturtevant J.M.* (1978). Incorporation of Saturated Fatty Acids into Phosphatidylcholine Bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, 444—450.
890. *Mabrey S., Mateo P.L., Sturtevant J.M.* (1978). High-sensitivity Calorimetric Study of Mixtures of Cholesterol with Dimyristoyl- and Dipalmitoylphosphatidylcholines, *Biochemistry*, **17**, 2464—2468.
891. *MacDonald A.L., Pink D.A.* (1987). Thermodynamics of Glycophorin in Phospholipid Bilayer Membranes, *Biochemistry*, **26**, 1909—1917.
892. *MacDonald J.R., Groschel-Stewart U., Walsh M.P.* (1987). Properties and Distribution of the Protein Inhibitor (M_r 17000) of Protein Kinase C, *Biochem. J.*, **242**, 695—705.
893. *Macdonald P.M., Sykes B.D., McElhaney R.N.* (1984). ¹⁹F NMR Studies of Lipid Fatty Acyl Chain Order and Dynamics in *Acholeplasma laidlawii* B. Membranes, ¹⁹F NMR Line Shape and Orientation Order in the Gel State, *Biochemistry*, **23**, 4496—4502.
894. *MacDonald P.M., Seelig J.* (1987). Calcium Binding to Mixed Phosphatidylglycerol-Phosphatidylcholine Bilayers as Studied by Deuterium Nuclear Magnetic Resonance, *Biochemistry*, **26**, 1231—1240.
895. *MacDonald P.M., Seelig J.* (1987). Calcium Binding to Mixed Cardiolipin-Phosphatidylcholine Bilayers as Studied by Deuterium Nuclear Magnetic Resonance, *Biochemistry*, **26**, 6292—6298.
896. *MacDonald R.C., Simon S.A.* (1987). Lipid Monolayer States and Their Relationships to Bilayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4089—4093.
897. *MacDonald R.I.* (1985). Membrane Fusion Due to Dehydration by Polyethylene Glycol, Dextran, or Sucrose, *Biochemistry*, **24**, 4058—4066.
898. *MacDonald R.I., MacDonald R.C.* (1983). Lipid Mixing During Freeze-Thawing of Liposome Membranes as Monitored by Fluorescence Energy Transfer, *Biochim. Biophys. Acta*, **735**, 243—251.
899. *Machamer C.E., Rose J.K.* (1987). A Specific Transmembrane Domain of a Coronavirus E1 Glycoprotein Is Required for Its Retention in the Golgi Region, *J. Cell Biol.*, **105**, 1205—1214.
900. *MacIntyre S., Freudl R., Degen M., Hindennach I., Henning U.* (1987). The Signal Sequence of an *Escherichia coli* Outer Membrane Protein Can Mediate Translocation of a Not Normally Secreted Protein across the Plasma Membrane, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8416—8422.
901. *Mackman N., Baker K., Gray L., Haigh R., Nicaud J.-M., Holland I.B.* (1987). Release of a Chimeric Protein into the Medium from *Escherichia coli* Using the C-terminal Secretion Signal of Hemolysin, *The EMBO Journal*, **6**, 2835—2841.
902. *MacLennan D.H., Brandl C.J., Korczak B., Green N.M.* (1985). Amino-acid Sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from Rabbit Muscle Sarcoplasmic Reticulum, Deduced from Its Complementary DNA Sequence, *Nature*, **316**, 696—700.
903. *Madden T.D., Hope M.J., Cullis P.R.* (1984). Influence of Vesicle Size and Oxidase Content on Respiratory Control in Reconstituted Cytochrome Oxidase Vesicles, *Biochemistry*, **23**, 1413—1418.
904. *Maher P., Singer S.J.* (1984). Structural Changes in Membranes Produced by the Binding of Small Amphiphilic Molecules, *Biochemistry*, **23**, 232—240.
905. *Maher P.A., Singer S.J.* (1985). Anomalous Interaction of the Acetylcholine Receptor Protein with the Nonionic Detergent Triton X-114, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 958—962.
906. *Maiden M.C.J., Davis E.O., Baldwin S.A., Moore D.C.M., Henderson P.J.F.* (1987). Mammalian and Bacterial Sugar Transport Proteins Are Homologous, *Nature*, **325**, 641—643.
907. *Majerus P.W., Wilson D.B., Connolly T.M., Bross T.E., Neufeld E.J.* (1985). Phosphoinositide Turnover Provides a Link in Stimulus-Response Coupling, *TIBS*, **10**, 168—171.
908. *Majerus P.W., Connolly T.M., Deckmyn H., Ross T.S., Bross T.E., Ishii H., Bansal V.S., Wilson D.B.* (1986). The Metabolism of Phosphoinositide-Derived Messenger Molecules, *Science*, **234**, 1519—1526.
909. *Makino S., Reynolds J.A., Tanford C.* (1973). The Binding of Deoxycholate and Triton X-100 to Proteins, *J. Biol. Chem.*, **248**, 4926—4932.
910. *Makowski L., Li J.* (1984). X-Ray Diffraction and Electron Microscope Studies of the Molecular Structure of Biological Membranes, *Biomembrane Structure and Function* (D. Chapman, Ed.), pp. 43—166, Verlag Chemie, Basel.
911. *Makriyanis A., Siminovich D.J., Das Gupta S.K., Griffin R.G.* (1986). Studies on the Interaction of Anesthetic Steroids with Phosphatidylcholine Using ²H and ¹³C Solid State NMR, *Biochim. Biophys. Acta*, **859**, 49—55.
912. *Maksymiw R., Sui S., Gaub H., Sackmann E.* (1987). Electrostatic Coupling of Spectrin Dimers to Phosphatidylserine Containing Lipid Lamellae, *Biochemistry*, **26**, 2983—2990.
913. *Malatesta F., Darley-Usmar V., de Jong C., Prochaska L.J., Bisson R., Capaldi R.A., Steffens G.C.M., Buse G.* (1983). Arrangement of Subunit IV of Beef Heart Cytochrome c Oxidase Probed by Chemical Labeling and Protease Digestion Experiments, *Biochemistry*, **22**, 4405—4411.
914. *Mamelok R.D., Groth D.F., Prusiner S.B.* (1980). Separation of Membrane-bound γ -Glutamyl Transpeptidase from Brush Border Transport and Enzyme Activities, *Biochemistry*, **19**, 2367—2373.
915. *Mangeat P., Burridge K.* (1984). Actin-Membrane Interactions in Fibroblasts: What Proteins Are Involved in This Association? *J. Cell Biol.*, **99**, 95s—103s.
916. *Manjunath C.K., Nicholson B.J., Teplow D., Hood L., Page E., Revel J.-P.* (1987). The Cardiac Gap Junction Protein (M_r47,000) Has a Tissue-Specific Cytoplasmic Domain of M_r 17,000 at its Carboxy-Terminus, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **142**, 228—234.
917. *Mann K.G.* (1987). The Assembly of Blood Clotting Complexes on Membranes, *TIBS*, **12**, 229—233.
918. *Manoil C., Beckwith J.* (1986). A Genetic Approach to Analyzing Membrane Protein Topology, *Science*, **233**, 1403—1408.
919. *Mantsch H.H., Martin A., Cameron D.G.* (1981). Characterization by Infrared Spectroscopy of the Bilayer to Nonbilayer Phase Transition of Phosphatidylethanolamines, *Biochemistry*, **20**, 3138—3145.
920. *Maraganore J.M.* (1987). Structural Elements for Protein-Phospholipid Interactions May Be Shared in Protein Kinase C and Phospholipase A₂, *TIBS*, **12**, 176—177.
921. *Marcelja S.* (1974). Chain Ordering in Lipid Crystals. II. Structure of Bilayer Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **367**, 165—176.
922. *Marchesi V.T., Furthmayr H., Tomita M.* (1976). The Red Cell Membrane, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 667—698.
923. *Marlin S.D., Springer T.A.* (1987). Purified Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Is a Ligand for Lymphocyte Function-Association Antigen 1 (LFA-1), *Cell*, **51**, 813—819.
924. *Marrack P., Kappler J.* (1987). The T Cell Receptor, *Science*, **238**, 1073—1079.

925. Marsh D. (1987). Selectivity of Lipid-Protein Interactions, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **19**, 677—689.
926. Marsh D., Watts A., Pates R.D., Uhl R., Knowles P.F., Esmann M. (1982). ESR Spin-Label Studies of Lipid-Protein Interactions in Membranes, *Biophys. J.*, **37**, 265—274.
927. Marsh M., Schmid S., Kern H., Harms E., Male P., Mellman I., Helenius A. (1987). Rapid Analytical and Preparative Isolation of Functional Endosomes by Free Flow Electrophoresis, *J. Cell Biol.*, **104**, 875—886.
928. Martin D.W., Tanford C., Reynolds J.A. (1984). Monomeric Solubilized Sarcoplasmic Reticulum Ca Pump Protein: Demonstration of Ca Binding and Dissociation Coupled to ATP Hydrolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6623—6626.
929. Martin O.C., Pagano R.E. (1987). Transbilayer Movement of Fluorescent Analogs of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine at the Plasma Membrane of Cultured Cells, *J. Biol. Chem.*, **262**, 5890—5898.
930. Marx J.L. (1987). Polyphosphoinositide Research Updated, *Science*, **235**, 974—976.
931. Masaki R., Yamamoto A., Tashiro Y. (1987). Cytochrome P-450 and NADPH-Cytochrome P-450 Reductase Are Degraded in the Autolysosomes in Rat Liver, *J. Cell Biol.*, **104**, 1207—1215.
932. Masamoto K. (1984). Dependence on Surface pH and Surface Concentration of Activity of Microsome-Bound Arylsulfatase C and Surface Charge Density in the Vicinity of the Enzyme, *J. Biochem.*, **95**, 715—719.
933. Masters C., Crane D. (1984). The Role of Peroxisomes in Lipid Metabolism, *TIBS*, **9**, 314—317.
934. Masters C.J. (1981). Interactions Between Soluble Enzymes and Subcellular Structure, *CRC Crit. Rev. Bioch.*, **11**, 105—143.
935. Masu Y., Nakayama K., Tamaki H., Harada Y., Kuno M., Nakanishi S. (1987). cDNA Cloning of Bovine Substance-K Receptor through Oocyte Expression System, *Nature*, **329**, 836—838.
936. Mather M.W., Gennis R.B. (1985). Spectroscopic Studies of Pyruvate Oxidase Flavoprotein from *Escherichia coli* Trapped in the Lipid-Activated Form by Crosslinking, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10 395—10 397.
937. Matlin K.S. (1986). The Sorting of Proteins to the Plasma Membrane in Epithelial Cells, *J. Cell Biol.*, **103**, 2565—2568.
938. Matsushita K., Patel L., Gennis R.B., Kaback H.R. (1983). Reconstitution of Active Transport in Proteoliposomes Containing Cytochrome c Oxidase and lac Carrier Protein Purified from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4889—4893.
939. Matteoni R., Kreis T.E. (1987). Translocation and Clustering of Endosomes and Lysosomes Depends on Microtubules, *J. Cell Biol.*, **105**, 1253—1265.
940. Mattoo A.K., Edelman M. (1987). Intramembrane Translocation and Posttranslational Palmitoylation of the Chloroplast 32-kDa Herbicide-binding Protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1497—1501.
941. Maurer A., McIntyre J.O., Churchill S., Fleischer S. (1985). Phospholipid Protection against Proteolysis of D- β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase, a Lecithin-requiring Enzyme, *J. Biol. Chem.*, **260**, 1661—1669.
942. May D.C., Ross E.M., Gilman A.G., Smigel M.D. (1985). Reconstitution of Catecholamine-stimulated Adenylate Cyclase Activity Using Three Purified Proteins, *J. Biol. Chem.*, **260**, 15829—15833.
943. May W.S., Sahyoun N., Jacobs S., Wolf M., Cuatrecasas P. (1985). Mechanism of Phorbol Diester-induced Regulation of Surface Transferrin Receptor Involves the Action of Activated Protein Kinase C and an Intact Cytoskeleton, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9414—9426.
944. Mayer L.D., Bally M.B., Hope M.J., Cullis P.R. (1985). Uptake of Dibucaine into Large Unilamellar Vesicles in Response to a Membrane Potential, *J. Biol. Chem.*, **260**, 802—808.
945. Mayer L.D., Pusey M.L., Griep M.A., Nelsestuen G.L. (1983). Association of Blood Coagulation Factors V and X with Phospholipid Monolayers, *Biochemistry*, **22**, 6226—6232.
946. McConnell H.M., Tamm L.K., Weis R.M. (1984). Periodic Structures in Lipid Monolayer Phase Transitions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3249—3253.
947. McConnell H.M., Watts T.H., Weis R.M., Brian A.A. (1986). Supported Planar Membranes in Studies of Cell-Cell Recognition in the Immune System, *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 95—106.
948. McDaniel R.V., Sharp K., Brooks D., McLaughlin A.C., Winiski A.P., Cafiso D., McLaughlin S. (1986). Electrokinetic and Electrostatic Properties of Bilayers Containing Gangliosides GM₁, GD_{1a}, or GT₁, *Biophys. J.*, **49**, 741—752.
949. McEhlaney R.N. (1986). Differential Scanning Calorimetric Studies of Lipid-Protein Interactions in Model Membrane Systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 361—421.
950. McIntosh T.J., Simon S.A., MacDonald R.A. (1980). The Organization of n-Alkanes in Lipid Bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 445—463.
951. McLaughlin S. (1983). Experimental Tests of the Assumptions Inherent in the Gouy-Chapman-Stern Theory of the Aqueous Diffuse Double Layer, *Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motions* (G. Spach, Ed.), pp. 69—76, Elsevier, Amsterdam.
952. McLaughlin S. (1977). Electrostatic Potentials at Membrane-Solution Interfaces, *Current Topics in Membranes and Transport*, **9**, 71—44.
953. McLaughlin S. (1982). Divalent Cations, Electrostatic Potentials, Bilayer Membranes, *Membranes and Transport* (A.N. Martonosi, Ed.), Vol. 1, pp. 51—55, Plenum Press, New York.
954. McLaughlin S., Mulrine N., Gresalfi T., Vaio G., McLaughlin A. (1981). Adsorption of Divalent Cations to Bilayer Membranes Containing Phosphatidylserine, *J. Gen. Physiol.*, **77**, 445—473.
- 955a. McLean L.R., Phillips M.C. (1984). Kinetics of Phosphatidylcholine and Lysophosphatidylcholine Exchange between Unilamellar Vesicles, *Biochemistry*, **23**, 4624—4630.
955. McLean L.R., Jackson R.L. (1985). Interaction of Lipoprotein Lipase and Apolipoprotein C-II with Sonicated Vesicles of 1,2-Ditetradecylphosphatidylcholine: Comparison of Binding Constants, *Biochemistry*, **24**, 4196—4201.
956. McMillan P.N., Luftig R.B. (1973). Preservation of Erythrocyte Ghost Ultrastructure Achieved by Various Fixatives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3060—3064.
957. McMillen D.A., Volwerk J.J., Ohishi J., Erion M., Keana J.F.W., Jost P.C., Hayes Griffith O. (1986). Identifying Regions of Membrane Proteins in Contact with Phospholipid Head Groups: Covalent Attachment of a New Class of Aldehyde Lipid Labels to Cytochrome c Oxidase, *Biochemistry*, **25**, 182—193.
958. McQueen N., Nayak D.P., Stephens E.B., Compans R.W. (1986). Polarized Expression of a Chimeric Protein in Which the Transmembrane and Cytoplasmic Domains of the Influenza Virus Hemagglutinin Have Been Replaced by Those of the Vesicular Stomatitis Virus G Protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9318—9322.
959. McQueen N.L., Nayak D.P., Stephens E.B., Compans R.W. (1987). Basolateral Expression of a Chimeric Protein in Which the Transmembrane and Cytoplasmic Domains of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Have Been Replaced by Those of the Influenza Virus Hemagglutinin, *J. Biol. Chem.*, **262**, 16 233—16 240.
- 959a. Medoff G., Kobayashi G.A. (1980). The Polyenes. *Antifungal Chemotherapy* (D.C.E. Speller, Ed.), pp. 3—33, John Wiley and Sons, New York.

960. Meier P. Sachse J.-H., Brophy P.J., Marsh D., Kothe G. (1987). Integral Membrane Proteins Significantly Decrease the Molecular Motion in Lipid Bilayers: A Deuteron NMR Relaxation Study of Membranes Containing Myelin Proteolipid Apoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3704—3708.
961. Meiri H., Spira G., Sammar M., Namir M., Schwartz A., Komoriya A., Kosower E.M., Palti Y. (1987). Mapping a Region Associated with Na Channel Inactivation Using Antibodies to a Synthetic Peptide Corresponding to a Part of the Channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5058—5062.
962. Meister H., Bachofen R., Semenza G., Brunner J. (1985). Membrane Topology of Light-harvesting Protein B870-alpha of *Rhodospirillum rubrum* G-9, *J. Biol. Chem.*, **260**, 16 326—16 331.
963. Melchers F., Andersson J. (1984). B Cell Activation: Three Steps and Their Variations, *Cell*, **37**, 715—720.
964. Melchior D.L. (1986). Lipid Domains in Fluid Membranes: A Quick-Freeze Differential Scanning Calorimetry Study, *Science*, **234**, 1577—1580.
965. Melis A., Svensson P., Albertsson P.-A. (1986). The Domain Organization of the Chloroplast Thylakoid Membrane. Localization of Photosystem I and of the Cytochrome b_6-f Complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 402—412.
966. Mellman I., Fuchs R., Helenius A. (1986). Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 663—700.
967. Menashe M., Romero G., Biltonen R.L., Lichtenberg D. (1986). Hydrolysis of Dipalmitoylphosphatidylcholine Small Unilamellar Vesicles by Porcine Pancreatic Phospholipase A2, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5328—5333.
968. Mendelsohn R., Dluhy R.A., Crawford T., Mantsch H.H. (1984). Interaction of Glycophorin with Phosphatidylserine: A Fourier Transform infrared Investigation, *Biochemistry*, **23**, 1498—1504.
969. Memestrina G., Voges K.-P., Jung G., Boheim G. (1986). Voltage-Dependent Channel Formation by Rods of Helical Polypeptides, *J. Membrane Biol.*, **93**, 111—132.
970. Menick D.R., Carrasco N., Antes L., Patel L., Kaback H.R. (1987). Lac Permease of *Escherichia coli*: Arginine-302 as a Component of the Postulated Proton Relay, *Biochemistry*, **26**, 6638—6644.
971. Menko A.S., Boettiger D. (1987). Occupation of the Extracellular Matrix Receptor, Integrin, Is a Control Point for Myogenic Differentiation, *Cell*, **51**, 51—57.
972. Menon A.K., Holowka D., Webb W.W., Baird B. (1986). Clustering, Mobility, and Triggering Activity of Small Oligomers of Immunoglobulin E on Rat Basophilic Leukemia Cells, *J. Cell Biol.*, **102**, 534—540.
973. Menon A.K., Holowka D., Webb W.W., Baird B. (1986). Cross-linking of Receptor-bound IgE to Aggregates Larger than Dimers Leads to Rapid Immobilization, *J. Cell Biol.*, **102**, 541—550.
974. Mertens K., Bertina R.M. (1984). The Contribution of Ca^{2+} and Phospholipids to the Activation of Human Blood-coagulation Factor X by Activated Factor IX, *Biochem. J.*, **223**, 607—615.
975. Messner D.J., Feller D.J., Scheuer T., Catterall W.A. (1986). Functional Properties of Rat Brain Sodium Channels Lacking the β_1 or β_2 Subunit, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14 882—14 890.
976. Metcalf T.N., III, Wang J.L., Schindler M. (1986). Lateral Diffusion of Phospholipids in the Plasma Membrane of Soybean Protoplasts: Evidence for Membrane Lipid Domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 95—99.
977. Metsikko K., van Meer G., Simons K. (1986). Reconstitution of the Fusogenic Activity of Vesicular Stomatitis Virus, *The EMBO Journal*, **5**, 3429—3435.
978. Michel H. (1982). Characterization and Crystal Packing of Three-dimensional Bacteriorhodopsin Crystals, *The EMBO Journal*, **1**, 1267—1271.
979. Michel H. (1983). Crystallization of Membrane Proteins, *TIBS*, **8**, 56—59.
980. Michel H. (1982). Three-Dimensional Crystals of a Membrane Protein Complex: The Photosynthetic Reaction Centre from *Rhodospseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.*, **158**, 567—572.
981. Michel H., Oesterhelt D., Henderson R. (1980). Orthorhombic Two-Dimensional Crystal Form of Purple Membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 338—342.
982. Michel H., Weyer K.A., Gruenberg H., Dunger I., Oesterhelt D., Lottspeich F. (1986). The "Light" and "Medium" Subunits of the Photosynthetic Reaction Centre from *Rhodospseudomonas viridis*: Isolation of the Genes, Nucleotide and Amino Acid Sequence, *The EMBO Journal*, **5**, 1149—1158.
983. Michel H., Epp O., Deisenhofer J. (1986). Pigment-Protein Interactions in the Photosynthetic Reaction Centre from *Rhodospseudomonas viridis*, *The EMBO Journal*, **5**, 2445—2451.
984. Michel B., Houslay M. (1986). Pleiotypic Responses: Regulation by Programmable Messenger or by Multiple Receptors? *TIBS*, **11**, 239—241.
985. Middelkoop E., Lubin B.H., Op den Kamp J.A.F., Roelofs B. (1986). Flip-Flop Rates of Individual Molecular Species of Phosphatidylcholine in the Human Red Cell Membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **855**, 421—424.
986. Middelkoop E., Lubin B.H., Op den Kamp J.A.F., Roelofs B. (1986). Flip-Flop Rates of Individual Molecular Species of Phosphatidylcholine in the Human Red Cell Membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **855**, 421—424.
987. Miller C., White M.M. (1980). A Voltage-dependent Chloride Conductance Channel from Torpedo Electropex Membrane, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **341**, 534—551.
988. Miller C., White M.M. (1984). Dimeric Structure of Single Chloride Channels from Torpedo Electropex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2772—2775.
989. Miller K.L., Lyon M.K. (1985). Do We Really Know Why Chloroplast Membranes Stack? *TIBS*, **10**, 219—222.
990. Miller M.J., Gennis R.B. (1983). The Purification and Characterization of the Cytochrome d Terminal Oxidase Complex of the *E. coli* Aerobic Respiratory Chain, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9159—9165.
991. Miller R.G. (1984). Interactions Between Digitonin and Bilayer Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **774**, 151—157.
992. Miller R.J. (1987). Multiple Calcium Channels and Neuronal Function, *Science*, **235**, 46—52.
993. Mimms L.T., Zampighi G., Nozaki Y., Tanford C., Reynolds J.A. (1981). Phospholipid Vesicle Formation and Transmembrane Protein Incorporation Using Octyl Glucoside, *Biochemistry*, **20**, 833—840.
994. Minami Y., Samelson L.E., Weissman A.M., Klausner R.D. (1987). Building a Multichain Receptor: Synthesis, Degradation, and Assembly of the T-cell Antigen Receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2688—2692.
995. Mischel M., Seelig J., Braganza L.F., Buldt G. (1987). A Neuron Diffraction Study of the Headgroup Conformation of Phosphatidylglycerol from *Escherichia coli* Membranes, *Chem. Phys. Lipids*, **43**, 237—246.
996. Mishina M., Kurosaki T., Tobimatsu T., Morimoto Y., Noda M., Yamamoto T., Terao M., Lindstrom J., Takahashi T., Kuno M., Nura S. (1984). Expression of Functional Acetylcholine Receptor from Cloned cDNAs, *Nature*, **307**, 604—608.
997. Mishina M., Tobimatsu T., Imoto K., Tanaka K., Fujita Y., Kurasaki M., Takahashi H., Morimoto Y., Hirose T., Inayama T., Takehashi T., Kuno M., Numa S. (1985). Loca-

- tion of Functional Regions of Acetylcholine Receptor α -Subunit by Site-directed Mutagenesis, *Nature*, **313**, 364—369.
998. Mitaku S., Hoshi S., Abe T., Kataoka R. (1984). Spectral Analysis of Amino Acid Sequence I: Intrinsic Membrane Proteins, *J. Phys. Japan*, **53**, 4083—4090.
 999. Miyazaki C., Kuroda M., Ohta A., Shibuya I. (1985). Genetic Manipulation of Membrane Phospholipid Composition in *Escherichia coli*: pgsA Mutants Defective in Phosphatidylglycerol Synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7530—7534.
 1000. Mize N.K., Andrews D.W., Lingappa V.R. (1986). A Stop Transfer Sequence Recognizes Receptors for Nascent Chain Translocation across the Endoplasmic Reticulum Membrane, *Cell*, **47**, 711—719.
 1001. Moe G.R., Miller R.J., Kaiser E.T. (1983). Design of a Peptide Hormone: Synthesis and Characterization of a Model Peptide with Calcitonin-like Activity, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4100—4102.
 1002. Mogi T., Stern L.J., Hackett N.R., Khorana H.G. (1987). Bacteriorhodopsin Mutants Containing Single Tyrosine to Phenylalanine Substitutions Are All Active in Proton Translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5595—5599.
 1003. Mohamed A.H., Steck T.L. (1986). Band 3 Tyrosine Kinase: Association with the Human Erythrocyte Membrane, *J. Biol. Chem.*, **261**, 2804—2809.
 1004. Mohandas N., Rossi M., Bernstein S., Ballas S., Ravindranath Y., Wyatt J., Mentzer W. (1985). The Structural Organization of Skeletal Proteins Influences Lipid Translocation Across Erythrocyte Membrane, *J. Biol. Chem.*, **260**, 14 264—14 268.
 1005. Mohraz M., Simpson M.V., Smith P.R. (1987). The Three-dimensional Structure of the Na, K-ATPase from Electron Microscopy, *J. Cell Biol.*, **105**, 1—8.
 1006. Molitoris B.A., Simon F.R. (1986). Maintenance of Epithelial Membrane Lipid Polarity: A Role for Differing Phospholipid Translocation Rates, *J. Membrane Biol.*, **94**, 47—53.
 1007. Mancuso C.A., Odham G., Westerdahl G., Reeve J.N., White D.C. (1985). C15, C20, and C25 Isoprenoid Homologues in Glycerol Diether Phospholipids of Methanogenic Archaeobacteria, *J. Lipid Res.*, **26**, 1120—1125.
 1008. Mondat M., Georgallas A., Pink D.A., Zuckermann M.J. (1984). The Thermodynamic Properties of Mixed Phospholipid Bilayers: A Theoretical Analysis, *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **62**, 796—802.
 1009. Montal M. (1974). Formation of Biomolecular Membranes from Lipid Monolayers, *Method in Enzym.*, **32**, 545—556.
 1010. Montal M. (1987). Reconstitution of Channel Proteins from Excitable Cells in Planar Lipid Bilayer Membranes, *J. Membrane Biol.*, **98**, 101—115.
 1011. Montal M., Darzon A., Schindler H. (1981). Functional Reassembly of Membrane Proteins in Planar Lipid Membranes, *Quart. Rev. Biophys.*, **14**, 1—79.
 1012. Montal M., Anholt R., Labarca P. (1986). The Reconstituted Acetylcholine Receptor, Ion Channel Reconstitution (C. Miller, Ed.), pp. 157—204, Plenum Publishing Corporation, New York.
 1013. Moore K.E., Miura S. (1987). A Small Hydrophobic Domain Anchors Leader Peptidase to the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8806—8813.
 1014. Moore M.S., Mahaffey D.T., Brodsky F.M., Anderson R.G.W. (1987). Assembly of Clathrin-Coated Pits onto Purified Plasma Membranes, *Science*, **236**, 558—563.
 1015. Mooseker M.S. (1983). Actin Binding Proteins of the Brush Border, *Cell*, **35**, 11—13.
 1016. Morgan C.G., Fitton J.E., Yianni Y.P. (1986). Fusogenic Activity of δ -Haemolysin from *Staphylococcus aureus* in Phospholipid Vesicles in the Liquid-Crystalline Phase, *Biochim. Biophys. Acta*, **863**, 129—138.
 1017. Morgan D.O., Edman J.C., Standring D.N., Fried V.A., Smith M.C., Roth R.A., Rutter W.J. (1987). Insulin-like Growth Factor II Receptor as a Multifunctional Binding Protein, *Nature*, **329**, 301—307.
 1018. Morita T., Issacs B.S., Esmon C.T., Johnson A.E. (1984). Derivatives of Blood Coagulation Factor IX Contain a High Affinity Ca^{2+} -binding Site That Lacks γ -Carboxyglutamic Acid, *J. Biol. Chem.*, **259**, 5698—5704.
 1019. Morona R., Kramer C., Henning U. (1985). Bacteriophage Receptor Area of Outer Membrane Protein OmpA of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriology*, **164**, 539—543.
 1020. Morris S.J., Schovanka I. (1977). Some Physical Properties of Adrenal Medulla Chromaffin Granules Isolated by a New Continuous Iso-osmotic Density Gradient Method, *Biochim. Biophys. Acta*, **464**, 53—64.
 1021. Morrow M.R., Huschilt J.C., Davis J.H. (1985). Simultaneous Modeling of Phase and Calorimetric Behaviour in an Amphiphilic Peptide/Phospholipid Model Membrane, *Biochemistry*, **24**, 5396—5406.
 1022. Mosckovitz R., Haring R., Gershoni J.M., Kloog Y., Sokolovsky M. (1987). Localization of Azidophencyclidine-binding Site on the Nicotinic Acetylcholine Receptor α -Subunit, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **145**, 810—816.
 1023. Mostov K.E., de Bruyn Kops A., Deitcher D.L. (1986). Deletion of the Cytoplasmic Domain of the Polymeric Immunoglobulin Receptor Prevents Basolateral Localization and Endocytosis, *Cell*, **47**, 359—364.
 1024. Mostov K.E., Simister N.E. (1985). Transcytosis, *Cell*, **43**, 389—390.
 1025. Mouritsen O.G., Bloom M. (1984). Mattress Model of Lipid-Protein Interactions in Membranes, *Biophys. J.*, **46**, 141—153.
 1026. Mowbray S.L., Koshland D.E. (1987). Additive and Independent Responses in a Single Receptor: Aspartate and Maltose Stimuli of the Tar Protein, *Cell*, **50**, 171—180.
 1027. Mueckler M., Caruso C., Baldwin S.A., Panico M., Blench I., Morris H.R., Allard W.J., Lienhard G.E., Lodish H.F. (1985). Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter, *Science*, **229**, 941—945.
 1028. Mueckler M., Lodish H.F. (1986). The Human Glucose Transporter Can Insert Post-translationally into Microsomes, *Cell*, **44**, 29—637.
 1029. Mueckler M., Lodish H.F. (1986). Post-Translational Insertion of a Fragment of the Glucose Transporter into Microsomes Requires Phosphoanhydride Bond Cleavage, *Nature*, **322**, 549—552.
 1030. Mueller P., Rudin P.O. (1968). Action Potentials Induced in Biomolecular Lipid Membranes, *Nature*, **217**, 713—719.
 1031. Mueller P., Chien T.F., Rudy B. (1983). Formation and Properties of Cell-Size Lipid Bilayer Vesicles, *Biophys. J.*, **44**, 375—381.
 1032. Muhlebach T., Cherry R.J. (1985). Rotational Diffusion and Self-Association of Band 3 in Reconstituted Lipid Vesicles, *Biochemistry*, **24**, 975—983.
 1033. Muller G., Zimmermann R. (1987). Import of Honeybee Prepromelittin into the Endoplasmic Reticulum: Structural Basis for Independence of SRP and Docking Protein, *The EMBO Journal*, **6**, 2099—2107.
 1034. Muller M., Blobel G. (1984). Protein Export in *Escherichia coli* Requires a Soluble Activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7737—7741.
 1035. Muller M., Moser R., Cheneval D., Carafoli E. (1985). Cardiolipin Is the Membrane Receptor for Mitochondrial Creatine Phosphokinase, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3839—3843.
 1036. Muller R. (1986). Proto-Oncogenes and Differentiation, *TIBS*, **11**, 129—132.
 1037. Muller W.E.G., Rottmann M., Diehl-Seifert B., de Kruijff B., Uhlenbruck G., Schroder H.C. (1987). Role of Aggregation Factor in the Regulation of Phosphoinositide Metabolism in Sponges, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9805—9858.
 1038. Munro S., Pelham H.R.B. (1987). A C-Terminal Signal Prevents Secretion of Luminal ER Proteins, *Cell*, **48**, 899—907.
 1039. Munthe-Kaas A.C., Seglen P.O. (1974). The Use of Metrizamide as a Gradient Medium for Isopicnic Separation of Rat Liver Cells, *FEBS Lett.*, **43**, 252—256.

1040. *Murata M, Nagayama K, Ohnishi S.* (1987). Membrane Fusion Activity of Succinylated Melittin Is Triggered by Protonation of Its Carboxyl Groups, *Biochemistry*, **26**, 4056—4062.
1041. *Murphy D.J.* (1982). The Importance of Not-planar Bilayer Regions in Photosynthetic Membranes and Their Stabilization by Galactolipids, *FEBS Lett.*, **150**, 19—26.
1042. *Murphy D.J.* (1986). The Molecular Organization of the Photosynthetic Membranes of Higher Plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 33—94.
1043. *Murray J.M.* (1983). Three-Dimensional Structure of a Membrane-Microtubule Complex, *J. Cell Biol.*, **98**, 283—295.
1044. *Mutsch B, Gains N, Hauser H.* (1986). Interaction of Intestinal Brush Border Membrane Vesicles with Small Unilamellar Phospholipid Vesicles, Exchange of Lipids between Membranes Is Mediated by Collisional Contact, *Biochemistry*, **25**, 2134—2140.
1045. *Myers A.C., Kovach J.S., Vuk-Pavlovic S.* (1987). Binding, Internalization, and Intracellular Processing of Protein Ligands: Derivation of Rate Constants by Computer Modeling, *J. Biol. Chem.*, **262**, 6494—6499.
1046. *Myers M., Mayorga O.L., Emtage J., Freire E.* (1987). Thermodynamic Characterization of Interactions between Ornithine Transcarbamylase Leader Peptide and Phospholipid Bilayer Membranes, *Biochemistry*, **26**, 4309—4315.
1047. *Nabedryk E., Bardin A.M., Breton J.* (1985). Further Characterization of Protein Secondary Structures in Purple Membrane by Circular Dichroism and Polarized Infrared Spectroscopies, *Biophys. J.*, **48**, 873—876.
1048. *Nagle J.F.* (1980). Theory of the Main Lipid Bilayer Phase Transition, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **31**, 157—195.
1049. *Nagle J.F.* (1987). Theory of Passive Proton Conductance in Lipid Bilayers, *J. Bioenerg. Biomemb.*, **19**, 413—426.
1050. *Nagle J.F., Morowitz H.J.* (1978). Molecular Mechanism for Proton Transport in Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 298—302.
1051. *Naidet C., Semeriva M., Yamada K.M., Thiery J.P.* (1987). Peptides Containing the Cell Attachment Recognition Signal Arg-Gly-Asp Prevent Gastrulation in *Drosophila* Embryos, *Nature*, **325**, 348—350.
1052. *Nakache M., Schreiber A.B., Gaub H., McConnell H.M.* (1985). Heterogeneity of Membrane Phospholipid Mobility in Endothelial Cells Depends on Cell Substrate, *Nature*, **317**, 75—77.
1053. *Nakae T.* (1986). Outer-Membrane Permeability of Bacteria, *CRC Critical Reviews in Microbiology*, **13**, 1—62.
1054. *Nakamura T., Ui M.* (1985). Simultaneous Inhibitions of Inositol Phospholipid Breakdown, Arachidonic Acid Release, and Histamine Secretion in Mast Cells by Islet-activating Protein, Pertussis Toxin, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3584—3593.
1055. *Nakashima R.A., Mangan P.S., Colombini M., Pederson P.L.* (1986). Hexokinase Receptor Complex in Hepatoma Mitochondria: Evidence from N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide-Labeling Studies for the Involvement of the Pore-Forming Protein VDAC, *Biochemistry*, **25**, 1015—1021.
1056. *Nelec M.J., Zborowski J., Famulski K.S., Wojtczak L.* (1980). Effect of Phospholipid Composition of the Surface Potential of Liposomes and the Activity of Enzymes Incorporated into Liposomes, *Eur. J. Biochem.*, **112**, 75—80.
1057. *Napier R.M., East J.M., Lee A.G.* (1987). State of Aggregation of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase Studied Using Saturation-Transfer Electron Spin Resonance, *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 365—373.
- 1057a. *Napier R.M., East J.M., Lee A.G.* (1987). State of Aggregation of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase Studied Using Chemical Cross-linking, *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 374—380.
- 1057b. *Nelander J.C., Blaurock A.E.* (1978). Disorder in Nerve Myelin: Phasing the Higher Order Reflections by Means of the Diffuse Scatter, *J. Mol. Biol.*, **118**, 497—532.
1058. *Nelson W.J., Veshnock P.J.* (1987). Ankyrin binding to $(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+})$ ATPase and Implications for the Organization of Membrane Domains in Polarized Cells, *Nature*, **328**, 533—536.
1059. *Nemes P.P., Miljanich G.P., White D.L., Dratz E.A.* (1980). Covalent Modification of Rhodopsin with Imidoesters: Evidence for Transmembrane Arrangement of Rhodopsin in Rod Outer Segments Disk Membranes, *Biochemistry*, **19**, 2067—2074.
1060. *Neumann D., Gershoni J.M., Fridkin M., Fuchs S.* (1985). Antibodies to Synthetic Peptides as Probes for the Binding Site on the α Subunit of the Acetylcholine Receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3490—3493.
1061. *Neville Jr. D.M., Hudson T.H.* (1986). Transmembrane Transport of Diphtheria Toxin, Related Toxin, and Colicins, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 195—224.
1062. *Newman M.J., Foster D.L., Wilson T.H., Kaback H.P.* (1981). Purification and Reconstitution of Functional Lactose Carrier from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11 804—11 808.
1063. *Newton A.C., Koshland D.E.* (1987). Protein Kinase C Autophosphorylates by an Intrapeptide Reaction, *J. Biol. Chem.*, **262**, 10185—10188.
1064. *Nguyen M., Shore G.C.* (1987). Import of Hybrid Vesicular Stomatitis G Protein to the Mitochondrial Inner Membrane, *J. Biol. Chem.*, **262**, 3929—3931.
1065. *Nicholls D.G.* (1982). *Bioenergetics*, Academic Press, New York.
1066. *Nichols J.W.* (1987). Binding of Fluorescent-labeled Phosphatidylcholine to Rat Liver Nonspecific Lipid Transfer Protein, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14 172—14 177.
1067. *Nicholson D.W., Kohler H., Neupert W.* (1987). Import of Cytochrome c into Mitochondria: Cytochrome c Heme Lyase, *Eur. J. Biochem.*, **164**, 147—157.
1068. *Nikaido H., Vaara M.* (1985). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability, *Microbiol. Rev.*, **49**, 1—32.
1069. *Nikawa J., Tsukagoshi Y., Kodaki T., Yamashita S.* (1987). Nucleotide Sequence and Characterization of the Yeast PSS Gene Encoding Phosphatidylserine Synthase, *Eur. J. Biochem.*, **167**, 7—12.
1070. *Nishikawa M., Nojima S., Akiyama T., Sankawa U., Inoue K.* (1984). Interaction of Digitonin and Its Analog with Membrane Cholesterol, *J. Biochem.*, **96**, 1231—1239.
1071. *Nishizuka Y.* (1984). The Role of Protein Kinase C in Cell Surface Signal Transduction and Tumour Promotion, *Nature*, **308**, 693—698.
1072. *Nisimoto Y., Lambeth D.* (1985). NADPH-Cytochrome P-450 Reductase-Cytochrome b₅ Interactions: Crosslinking of the Phospholipid Vesicle-Associated Proteins by a Water-Soluble Carbodiimide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 386—396.
1073. *Noda M., Yoon K., Rodan G.A., Koppel D.E.* (1987). High Lateral Mobility of Endogenous and Transfected Alkaline Phosphatase: A Phosphatidylinositol-anchored Membrane Protein, *J. Cell. Biol.*, **105**, 1671—1677.
1074. *Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H., Kanaoka Y., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Raftery M.A., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S.* (1984). Primary Structure of Electrophorus electricus, Sodium Channel Deduced from cDNA Sequence, *Nature*, **312**, 121—127.
1075. *Noda M., Ikeda T., Suzuki H., Takeshima H., Takahashi T., Kuno M., Numa S.* (1986). Expression of Functional Sodium Channels from Cloned cDNA, *Nature*, **322**, 826—828.
1076. *Noda M., Ikeda T., Kayano T., Suzuki H., Takeshima H., Kurasaki M., Takahashi H., Numa S.* (1986). Existence of Distinct Sodium Channel Messenger RNAs in Rat Brain, *Nature*, **320**, 188—192.

1077. *Noguchi S., Noda M., Takahashi H., Kawakami K., Ohta T., Nagano K., Hirose T., Inayama S., Kawamura M., Numa S.* (1986). Primary Structure of the β -Subunit of *Torpedo californica* ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase Deduced from the cDNA Sequence, *FEBS Lett.*, **196**, 315—320.
1078. *Nojiri H., Takaku F., Terui Y., Miura Y., Saito M.* (1986). Ganglioside GM_3 : An Acidic Membrane Component That Increases During Macrophage-Like Cell Differentiation Can Induce Monocytic Differentiation of Human Myeloid and Monocytoid Leukemic Cell Lines HL-60 and U937, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 782—786.
1079. *Noordam P.C., Killian A., Oude Elferink R.F.M., de Gier J.* (1982). Comparative Study on the Properties of Saturated Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine Bilayers Barrier Characteristics and Susceptibility to Phospholipase A2 Degradation, *Chem. Phys. Lipids*, **31**, 191—204.
1080. *Noren O., Sjoström H., Cowell G.M., Tranum-Jensen J., Hansen O.C., Welinder K.G.* (1986). Pig Intestinal Microvillar Maltase-glucoamylase: Structure and Membrane Insertion, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12 306—12 309.
1081. *Nose A., Nagafuchi A., Takeichi M.* (1987). Isolation of Placental Cadherin cDNA: Identification of a Novel Gene Family of Cell-Cell Adhesion Molecules, *The EMBO Journal*, **6**, 3655—3662.
1082. *Nozaki Y., Reynolds J.A., Tanford C.* (1978). Conformational States of a Hydrophobic Protein: The Coat Protein of fd Bacteriophage, *Biochemistry*, **17**, 1239—1246.
1083. *O'Brien T.A., Blake R., Gennis R.B.* (1977). Regulation by Lipids of Cofactor Binding to a Peripheral Membrane Enzyme: Binding of Thiamin Pyrophosphate to Pyruvate Oxidase, *Biochemistry*, **16**, 3105—3109.
1084. *O'Leary T.J., Levin I.W.* (1984). Raman Spectroscopic Study of an Interdigitated Lipid Bilayer Dipalmitoylphosphatidylcholine Dispersed in Glycerol, *Biochim. Biophys. Acta*, **776**, 185—189.
1085. *O'Neill L.J., Miller J.G., Peterson N.O.* (1986). Evidence of Nystatin Micelles in L-Cell Membranes from Fluorescence Photobleaching Measurements of Diffusion, *Biochemistry*, **25**, 177—181.
1086. *O'Shea P.S., Petrone G., Casey R.P., Azzi A.* (1984). The Current-Voltage Relationships of Liposomes and Mitochondria, *Biochem. J.*, **219**, 719—726.
1087. *O'Shea P.S., Feuerstein-Thelen S., Azzi A.* (1984). Membrane-potential-dependent Changes of the Lipid Microviscosity of Mitochondria and Phospholipid Vesicles, *Biochem. J.*, **220**, 795—801.
1088. *Ohba M., Schatz G.* (1987). Disruption of the Outer Membrane Restores Protein Import to Trypsin-treated Yeast Mitochondria, *The EMBO Journal*, **6**, 2117—2122.
1089. *Ohba M., Schatz G.* (1987). Protein Import into Yeast Mitochondria. Is Inhibited by Antibodies Raised against 45-kd Proteins of the Outer Membrane, *The EMBO Journal*, **6**, 2109—2115.
1090. *Ohno-Iwashita Y., Wolfe P., Ito K., Wickner W.* (1984). Processing of Preproteins by Liposomes Bearing Leader Peptidase, *Biochemistry*, **23**, 6178—6184.
1091. *Ohta A., Obara T., Asami Y., Shibuya I.* (1985). Molecular Cloning of the *cls* Gene Responsible for Cardiolipin Synthesis in *Escherichia coli* and Phenotypic Consequences of Its Amplification, *J. Bacteriology*, **163**, 506—514.
1092. *Oldfield E., Chapman D.* (1972). Dynamics of Lipids in Membranes: Heterogeneity and the Role of Cholesterol, *FEBS Lett.*, **23**, 285—297.
1093. *Oldfield E., Bowers J.L., Forbes J.* (1987). High-Resolution Proton and Carbon-13 NMR of Membranes: Why Sonicate? *Biochemistry*, **26**, 6919—6923.
1094. *Olson E.N., Glaser L., Merlie J.P.* (1984). α and β Subunits of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Contains Covalently Bound Lipid, *J. Biol. Chem.*, **259**, 5364—5367.
1095. *Oosawa K., Simon M.* (1986). Analysis of Mutations in the Transmembrane Region of the Aspartate Chemoreceptor in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6930—6934.
1096. *Op den Kamp J.A.F.* (1981). The Asymmetric Architecture of Membranes, *Membrane Structure* (J.B. Finean and R.H. Michell, Eds.), pp. 83—126, Elsevier, New York.
1097. *Op den Kamp J.A.F.* (1979). Lipid Asymmetry in Membranes, *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 47—71.
1098. *Op den Kamp J.A.F., Roelofs B., Van Deenen L.L.M.* (1985). Structural and Dynamic Aspects of Phosphatidylcholine in the Human Erythrocyte Membrane, *TIBS*, **10**, 320—323.
1099. *Orci L., Glick B.S., Rothman J.E.* (1986). A New Type of Coated Vesicular Carrier That Appears Not to Contain Clathrin: Its Possible Role in Protein Transport within the Golgi Stack, *Cell*, **46**, 171—184.
1100. *Orci L., Ravazzola M., Anderson R.G.W.* (1987). The Condensing Vacuole of Exocrine Cells Is More Acidic Than the Mature Secretory Vesicle, *Nature*, **326**, 77—79.
1101. *Osborn M., Weber K.* (1986). Intermediate Filament Proteins: A Multigene Family Distinguishing Major Cell Lineages, *TIBS*, **11**, 469—472.
1102. *Osborn M.J., Munson R.* (1974). Separation of the Inner (Cytoplasmic) and Outer Membranes of Gram-Negative Bacteria, *Methods in Enz.*, **31**, 642—653.
1103. *Osterman D.G., Kaiser E.T.* (1985). Design and Characterization of Peptides with Amphiphilic β -Strand Structures, *J. Cellular Biochem.*, **29**, 57—72.
1104. *Ott P.* (1985). Membrane Acetylcholinesterases: Purification, Molecular Properties and Interactions with Amphiphilic Environments, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 375—393.
1105. *Ottolenghi P.* (1979). The Relipidation of Delipidated Na, K-ATPase: An Analysis of Complex Formation with Dioleoylphosphatidylcholine and with Dioleoylphosphatidylethanolamine, *Eur. J. Biochem.*, **99**, 113—131.
1106. *Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Kiselev A.V.* (1984). Bacteriorhodopsin Topography in Purple Membrane, *Biological Membranes* (D. Chapman, Ed.), Vol. 5, pp. 197—220, Academic Press, New York.
1107. *Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Feigina M.Y., Kiselev A.V., Lobanov N.A.* (1979). The Structural Basis of the Functioning of Bacteriorhodopsin: An Overview, *FEBS Lett.*, **100**, 219—224.
1108. *Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Vasilov R.G., Vturina I.Y., Kuryatov A.B., Kiselev A.V.* (1985). The Antigenic Structure and Topography of Bacteriorhodopsin in Purple Membranes as Determined by Interaction with Monoclonal Antibodies, *FEBS Lett.*, **179**, 343—350.
1109. *Ovchinnikov Y.A., Demin V.V., Barnakov A.N., Kuzin A.P., Lunev A.V., Modyanov N.N., Dzhandzhugazyan K.N.* (1985). Three-dimensional Structure of ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase Revealed by Electron Microscopy of Two-dimensional Crystals, *FEBS Lett.*, **190**, 73—76.
1110. *Ovchinnikov Y.A.* (1987). Probing the Folding of Membrane Proteins, *TIBS*, **12**, 434—438.
1111. *Ovchinnikov Y.A., Arzamazova N.M., Arystarkhova E.A., Gevondyan N.M., Aldanova N.A., Modyanov N.N.* (1987). Detailed Structural Analysis of exposed Domains of Membrane-bound Na^+ , K^+ -ATPase, *FEBS Lett.*, **217**, 269—274.
1112. *Overton E.* (1985). Über die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen und Tierzelle, *Vjsch. Naturf. Ges. Zurich.*, **40**, 159—201.
1113. *Ozols J.* (1972). Cytochrome b_5 from a Normal Human Liver, *J. Biol. Chem.*, **247**, 2242—2244.
1114. *Ozols J., Heinemann F.S., Johnson E.F.* (1985). The Complete Amino Acid Sequence

- of a Constitutive Form of Liver Microsomal Cytochrome P-450, *J. Biol. Chem.*, **260**, 5427—5434.
1115. *Paabo S., Bhat B.M., Wold W.S.M., Peterson P.A.* (1987). A Short Sequence in the COOH-Terminus Makes an Adenovirus Membrane Glycoprotein a Resident of the Endoplasmic Reticulum, *Cell*, **50**, 311—317.
 1116. *Page M.G.P., Rosenbusch J.P.* (1986). Topographic Labelling of Pore-forming Proteins from the Outer Membrane of *Escherichia coli*, *Biochem. J.*, **235**, 651—661.
 1117. *Pain D., Blobel G.* (1987). Protein Import into Chloroplasts Requires a Chloroplast ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3288—3292.
 1118. *Pajares M.A., Alemany S., Valera I., Marin Cao D., Mato J.M.* (1984). Purification and Photo-Affinity Labelling of Lipid Methyltransferase from Rat Liver, *Biochem. J.*, **223**, 61—66.
 1119. *Papahadjopoulos D., Vail W.J., Jacobson K., Poste G.* (1975). Cochleate Lipid Cylinders: Formation by Fusion of Unilamellar Lipid Vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 483—491.
 1120. *Parente R.A., Lentz B.R.* (1984). Phase Behavior of Large Unilamellar Vesicles Composed of Synthetic Phospholipids, *Biochemistry*, **23**, 2353—2362.
 1121. *Parker P.J., Coussens L., Totty N., Rhee L., Young S., Chen E., Stabel S., Waterfield M.D., Ullrich A.* (1986). The Complete Primary Structure of Protein Kinase C—the Major Phorbol Ester Receptor, *Science*, **233**, 853—859.
 1122. *Parsonage D., Wilke-Mounts S., Senior A.E.* (1987). Directed Mutagenesis of the β -Subunit of F_1 -ATPase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8022—8026.
 1123. *Parsonage D., Duncan T.M., Wilke-Mounts S., Kironde F.A.S., Hatch L., Senior A.E.* (1987). The Defective Proton-ATPase of uncD Mutants of *Escherichia coli*: Identification by DNA-Sequencing of Residues in the β -Subunit Which Are Essential for Catalysis or Normal Assembly, *J. Biol. Chem.*, **262**, 6301—6307.
 1124. *Parthasarathy R., Eisenberg F.* (1986). The Inositol Phospholipids: A Stereochemical View of Biological Activity, *Biochem. J.*, **235**, 313—322.
 1125. *Pascher I., Sundell S.* (1977). Molecular Arrangements in Sphingolipids. The Crystal Structure of Cerebroside, *Chem. Phys. Lipids*, **20**, 175—191.
 1126. *Pascher I., Sundell S., Harlos K., Eibl H.* (1987). Conformation and Packing Properties of Membrane Lipids: The Crystal Structure of Sodium Dimyristoylphosphatidylglycerol, *Biochim. Biophys. Acta*, **896**, 77—88.
 1127. *Pasternack G.R., Anderson R.A., Leto T.L., Marchesi V.T.* (1985). Interactions Between Protein 4.1 and Band 3: An Alternative Binding Site for an Element of the Membrane Skeleton, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3676—3683.
 1128. *Pates R.D., Marsh D.* (1987). Lipid Mobility and Order in Bovine Rod Outer Segment Disk Membranes. A Spin-Label Study of Lipid-Protein Interactions, *Biochemistry*, **26**, 29—39.
 1129. *Paul C., Rosenbush J.P.* (1985). Folding Patterns of Porin and Bacteriorhodopsin, *The EMBO Journal*, **4**, 1593—1597.
 1130. *Pearse B.M.F., Crowther R.A.* (1987). Structure and Assembly of Coated Vesicles, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **16**, 49—68.
 1131. *Pearson L.T., Edelman J., Chan S.I.* (1984). Statistical Mechanisms of Lipid Membranes: Protein Correlation Functions and Lipid Ordering, *Biophys. J.*, **45**, 863—871.
 1132. *Pearson L.T., Chan S.I., Lewis B.A., Engelman D.M.* (1983). Pair Distribution Functions of Bacteriorhodopsin and Rhodopsin in Model Bilayers, *Biophys. J.*, **43**, 167—174.
 1133. *Pearson R.H., Pascher I.* (1979). The Molecular Structure of Lecithin Hydrates, *Nature*, **281**, 499—501.
 1134. *Pedersen P.L., Carafoli E.* (1987). Ion Motive ATPases. I. Ubiquity, Properties, and Significance to Cell Function, *TIBS*, **12**, 146—150.
 1135. *Peerce B.E., Wright E.M.* (1987). Examination of the Na^+ -Induced Conformational Change of the Intestinal Brush Border Sodium/Glucose Symporter Using Fluorescent Probes, *Biochemistry*, **26**, 4272—4279.
 1136. *Perara E., Rothman R.E., Lingappa V.R.* (1986). Uncoupling Translocation from Translocation: Implications for Transport of Proteins Across Membranes, *Science*, **232**, 348—352.
 1137. *Perara E., Lingappa V.R.* (1985). A Former Amino Terminal Signal Sequence Engineered to an Internal Location Directs Translocation of Both Franking Protein Domains, *J. Cell Biol.*, **101**, 2292—2301.
 1138. *Perides G., Harter C., Traub P.* (1987). Electrostatic and Hydrophobic Interactions of the Intermediate Filament Protein Vimentin and Its Amino Terminus with Lipid Bilayers, *J. Biol. Chem.*, **262**, 13 742—13 749.
 1139. *Perkins W.R., Cafiso D.S.* (1987). Characterization of H^+ /OH-Currents in Phospholipid Vesicles, *J. Bioenerg. Biomemb.*, **19**, 443—455.
 1140. *Pertoft H., Laurent T.C., Seljelid R., Akerstrom G., Kagedal L., Hirtenstein M.* (1979). The Use of Density Gradients of Percoll for the Separation of Biological Particles, Separation of Cells and Subcellular Elements (H. Peeters, Ed.), pp. 67—72, Pergamon Press, New York.
 1141. *Peschke J., Riegler J., Mohwald H.* (1987). Quantitative Analysis of Membrane Distortions Induced by Mismatch of Protein and Lipid Hydrophobic Thickness, *Eur. Biophys. J.*, **14**, 385—391.
 1142. *Pessin J.E., Glaser M.* (1980). Budding of Rous Sarcoma Virus and Vesicular Stomatitis Virus from Localized Lipid Regions in the Plasma Membrane of Chicken Embryo Fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **255**, 9044—9050.
 1143. *Peters J., Takemoto J., Drews G.* (1983). Spatial Relationships Between the Photochemical Reaction Center and the Light Harvesting Complexes in the Membrane of *Rhodospseudomonas capsulata*, *Biochemistry*, **22**, 5660—5667.
 1144. *Peters K.-R., Palade G.E., Schneider B.G., Papermaster D.S.* (1983). Fine Structure of a Periciliary Ridge Complex of Frog Retinal Cells Revealed by Ultrahigh Resolution Scanning Electron Microscopy, *J. Cell Biol.*, **96**, 265—276.
 1145. *Peters R., Beck K.* (1983). Translational Diffusion in Phospholipid Monolayers Measured by Fluorescence Microphotolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7183—7187.
 1146. *Peterson A.A., Cramer W.A.* (1987). Voltage-Dependent, Monomeric Channel Activity of Colicin E1 in Artificial Membrane Vesicles, *J. Membrane Biol.*, **99**, 197—204.
 1147. *Pfaller R., Neupert W.* (1987). High-Affinity Binding Sites Involved in the Import of Porin into Mitochondria, *The EMBO Journal*, **6**, 2635—2642.
 1148. *Pfanner N., Muller H.K., Harmey M.A., Neupert W.* (1987). Mitochondrial Protein Import: Involvement of the Mature Part of a Cleavable Precursor Protein in the Binding to Receptor Sites, *The EMBO Journal*, **6**, 3449—3454.
 1149. *Pfanner N., Tropschung M., Neupert W.* (1987). Mitochondrial Protein Import: Nucleoside Triphosphates Are Involved in Conferring Import-Competence to Precursors, *Cell*, **49**, 815—823.
 1150. *Pfanner N., Hoeben P., Tropschung M., Neupert W.* (1987). The Carboxyl-Terminal Two-Thirds of the ADP/ATP Carrier Polypeptide Contains Sufficient Information to Direct Translocation into Mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14 851—14 854.
 1151. *Pfanner N., Neupert W.* (1985). Transport of Proteins into Mitochondria: A Potassium Diffusion Potential Is Able to Drive the Import of ADP/ATP Carrier, *The EMBO Journal*, **4**, 2819—2825.
 1152. *Pfanner N., Neupert W.* (1987). Distinct Steps in the Import of ADP/ATP Carrier into Mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **262**, 7528—7536.

1153. Pfeiffer S.R., Rothman J.E. (1987). Biosynthetic Protein Transport and Sorting by the Endoplasmic Reticulum and Golgi, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 829—852.
1154. Phillips M.C., Johnson W.J., Rothblat G.H. (1987). Mechanisms and Consequences of Cellular Cholesterol Exchange and Transfer, *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 223—276.
1155. Piela L., Nemethy G., Scheraga H.A. (1987). Proline-Induced Constraints in α -Helices, *Biopolymers*, **26**, 1587—1600.
1156. Pierce G.N., Philipson K.D. (1985). Binding of Glycolytic Enzymes to Cardiac Sarcolemmal and Sarcoplasmic Reticular Membranes, *J. Biol. Chem.*, **260**, 6862—6870.
1157. Pieterse W.A., Vidal J.C., Volwerk J.J., de Haas G.H. (1974). Zymogen-Catalyzed Hydrolysis of Monomeric Substrates and the Presence of a Recognition Site for Lipid-Water Interfaces in Phospholipase A2, *Biochemistry*, **13**, 1455—1460.
1158. Pike L.J., Eakes A.T. (1987). Epidermal Growth Factor Stimulates the Production of Phosphatidylinositol Monophosphate and the Breakdown of Polyphosphoinositides in A431 Cells, *J. Biol. Chem.*, **262**, 1644—1651.
1159. Pilch P.F., Czech M.P. (1979). Interaction of Cross-linking Agents with the Insulin Effector Systems of Isolated Fat Cells, *J. Biol. Chem.*, **254**, 3375—3381.
1160. Pink D.A. (1984). Theoretical Studies of Phospholipid Bilayers and Monolayers. Perturbing Probes, Monolayer Phase Transitions, and Computer Simulation of Lipid-Protein Bilayers, *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **62**, 760—777.
1161. Pink D.A. (1984). Theoretical Models of Monolayers, Bilayers and Biological Membranes, *Biomembrane Structure and Function* (D. Chapman, Ed.), pp. 319—354, Verlag Chemie, Basel.
1162. Pink D.A. (1985). Protein Lateral Movement in Lipid Bilayers. Stimulation Studies of Its Dependence upon Protein Concentration, *Biochim. Biophys. Acta*, **818**, 200—204.
1163. Pink D.A. (1982). Theoretical Models of Phase Changes in One- and Two-Component Lipid Bilayers, *Biological Membranes* (D. Chapman, Ed.), Vol. 4, pp. 131—178, Academic Press, New York.
1164. Pink D.A., Laidlaw D.J., Chisholm D.M. (1986). Protein Lateral Movement in Lipid Bilayers. Monte Carlo Simulation Studies of Its Dependence upon Attractive Protein-Protein Interactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **863**, 9—17.
1165. Pink D.A., MacDonald A.L. (1986). Theoretical Studies of Phospholipid-Glycophorin Bilayer Membranes Using Electron Spin Resonance and Fluorescent Probes, *Biochim. Biophys. Acta*, **863**, 243—252.
1166. Pink D.A., Chapman D., Laidlaw D.J., Wiedmer T. (1984). Electron Spin Resonance and Steady State Fluorescence Polarization Studies of Lipid Bilayers Containing Integral Proteins, *Biochemistry*, **23**, 4051—4058.
1167. Piomelli D., Volterra A., Dale N., Siegelbaum S.A., Kandel E.R., Schwartz J.H., Belardetti F. (1987). Lipoygenase Metabolites of Arachidonic Acid as Second Messengers for Presynaptic Inhibition of Aplysia Secondary Cells, *Nature*, **328**, 38—43.
1168. Pohlman R., Nagel G., Schmidt B., Stein M., Lorkowski G., Krentler C., Cully J., Meyer H.E., Grzeschik K.-H., Mersmann G., Hasilik A., von Figura K. (1987). Cloning of a cDNA Encoding the Human Cation-dependent Mannose 6-Phosphate-Specific Receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5575—5579.
1169. Pollet R.J., Haase B.A., Standaert M.L. (1981). Characterization of Detergent-solubilized Membrane Proteins: Hydrodynamic and Sedimentation Equilibrium Properties of the Insulin Receptor of the Cultured Lymphoblastoid Cell, *J. Biol. Chem.*, **256**, 12 118—12 126.
1170. Porpaczy Z.B., Sumegi B., Alkonyi I. (1987). Interaction between NAD-dependent Isocitrate Dehydrogenase, α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex, and NADH: Ubiquinone Oxidoreductase, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9509—9514.
1171. Powell G.L., Knowles P.F., Marsh D. (1985). Association of Spin-labelled Cardiolipin with Dimyristoylphosphatidylcholine-Substituted Bovine Heart Cytochrome c Oxidase. A Generalized Specificity Increase Rather than Highly Specific Binding Sites, *Biochim. Biophys. Acta*, **816**, 191—194.
1172. Pownall H.J., Knapp R.D., Gotto A.M., Massey J.B. (1983). Helical Amphipathic Moment: Application to Plasma Lipoproteins, *FEBS Lett.*, **159**, 17—23.
1173. Prasad R.V., Yamaguchi M., Hatefi Y. (1986). Role of Phospholipids in Activation of Mitochondrial D(-)- β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase, *Biochem. Int.*, **12**, 641—648.
1174. Prats M., Teissie J., Töcane J.-F. (1986). Lateral Proton Conduction at Lipid-Water Interfaces and Its Implications for the Chemiosmotic-Coupling Hypothesis, *Nature*, **322**, 756—758.
1175. Prats M., Töcane J.-F., Teissie J. (1987). Lateral Proton Conduction at a Lipid/Water Interface, Effects of Lipid Nature and Ionic Content of the Aqueous Phase, *Eur. J. Biochem.*, **162**, 379—385.
1176. Pressman B.C. (1973). Properties of Ionophores with Broad Range of Cation Selectivity, *Fed. Proc.*, **32**, 1698—1703.
1177. Pribluda V.S., Metzger H. (1987). Calcium-independent Phosphoinositide Breakdown in Rat Basophilic Leukemia Cells: Evidence for an Early Rise in Inositol 1,4,5-Triphosphate Which Precedes the Rise in Other Inositol Phosphates and in Cytoplasmic Calcium, *J. Biol. Chem.*, **262**, 11449—11454.
1178. Price C.A. (1982). *Centrifugation in Density Gradients*, Academic Press, New York.
1179. Price C.A. (1974). Plant Cell Fractionation, *Methods in Enz.*, **31**, 501—519.
1180. Prigent-Dachary J., Faucon J.-F., Boisseau M.-R., Dufourcq J. (1986). Topology of the Binding Site of Blood-clotting Factors in Model Membranes: A Fluorescence Study, *Eur. J. Biochem.*, **155**, 133—140.
1181. Prince R.C. (1987). Hopanoids: The World's Most Abundant Biomolecules? *TIBS*, **12**, 455—456.
1182. Prochaska L., Bisson R., Capaldi R.A. (1980). Structure of the Cytochrome c Oxidase Complex: Labelling by Hydrophilic and Hydrophobic Protein Modifying Reagents, *Biochemistry*, **19**, 3174—3179.
1183. Prochaska L.J., Fink P.S. (1987). On the Role of Subunit III in Proton Translocation in Cytochrome c Oxidase, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **19**, 143—166.
1184. Pryde J.G. (1986). Triton X-114: A Detergent That Has Come in from the Cold, *TIBS*, **11**, 160—163.
1185. Prywes R., Livneh E., Ullrich A., Schlessinger J. (1986). Mutations in the Cytoplasmic Domain of EGF Receptor Affect EGF Binding and Receptor Internalization, *The EMBO Journal*, **5**, 2179—2190.
1186. Puddington L., Woodgett C., Rose J.K. (1987). Replacement of the Cytoplasmic Domain Alters Sorting of a Viral Glycoprotein in Polarized Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2756—2760.
1187. Quirocho F.A., Sack J.S., Vyas N.K. (1987). Stabilization of Charges on Isolated Ionic Groups Sequestered in Proteins by Polarized Peptide Units, *Nature*, **329**, 561—564.
1188. Raetz C.R.H., Carman G.M., Dowhan W., Jiang R.-T., Waszkuc W., Loffredo W., Tsai M.-D. (1987). Phospholipids Chiral at Phosphorus. Steric Course of the Reactions Catalyzed by Phosphatidylserine Synthase from *Escherichia coli* and Yeast, *Biochemistry*, **26**, 4022—4027.
1189. Raftery M.A., Hunkapiller M.W., Strader C.D., Hood L.E. (1980). Acetylcholine Receptor: Complex of Homologous Subunits, *Science*, **208**, 1454—1457.
1190. Ragan C.I., Reed J.J. (1986). Regulation of Electron Transfer by the Quinone Pool, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **18**, 403—418.

1191. *Randall L.L., Hardy S.J.S.* (1986). Correlation of competence for Export with Lack of Tertiary Structure of the Mature Species: A Study in Vivo of Maltose-Binding Protein in *E. coli*, *Cell*, **46**, 921—828.
1192. *Randall L.L., Hardy S.J.S.* (1984). Export of Protein in Bacteria, *Microbiological Reviews*, **48**, 290—298.
1193. *Rand R.P., Parsegian V.A.* (1984). Physical Force Considerations in Model and Biological Membranes, *Can. J. Biochem., Cell Biol.*, **62**, 752—759.
1194. *Rao J.K.M., Argos P.* (1986). A Conformational Preference Parameter to Predict Helices in Integral Membrane Proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **869**, 197—214.
1195. *Rapoport T.A.* (1986). Protein Translocation Across and Integration Into Membranes, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **20**, 73—137.
1196. *Rapoport T.A., Heinrich R., Walter P., Schulmeister T.* (1987). Mathematical Modeling of the Effects of the Signal Recognition Particle on Translation and Translocation of Proteins Across the Endoplasmic Reticulum Membrane, *J. Mol. Biol.*, **195**, 621—636.
1197. *Rashin A.A., Honig B.* (1984). On the Environment of Ionizable Groups in Globular Proteins, *J. Mol. Biol.*, **173**, 515—521.
1198. *Ratnam M., Le Nguyen D., Rivier J., Sargent P.B., Lindstrom J.* (1986). Transmembrane Topography of Nicotinic Acetylcholine Receptor: Immunochemical Tests Contradict Theoretical Predictions Based on Hydrophobicity Profiles, *Biochemistry*, **25**, 2633—2643.
1199. *Ratnam M., Sargent P.B., Sarin V., Fox J.L., Le Nguyen D., Rivier J., Criado M., Lindstrom J.* (1986). Location of Antigenic Determinants on Primary Sequences of Subunits of Nicotinic Acetylcholine Receptor by Peptide Mapping, *Biochemistry*, **25**, 2621—2632.
1200. *Ratnam M., Gullick W., Spiess J., Wan K., Criado M., Lindstrom J.* (1986). Structural Heterogeneity of the α Subunits of the Nicotinic Acetylcholine Receptor in Relation to Agonist Affinity Alkylation and Antagonist Binding, *Biochemistry*, **25**, 4268—4275.
1201. *Raudino A., Mauzerall D.* (1986). Dielectric Properties of the Polar Head Group Region of Zwitterionic Lipid Bilayers, *Biophys. J.*, **50**, 441—449.
1202. *Raveitch J.V., Luster A.D., Weinshank R., Kochan J., Pavlovic A., Portnoy D.A., Hulmes J., Pan Y.-C.E., Unkeless J.C.* (1986). Structural Heterogeneity and Functional Domains of Murine Immunoglobulin G Fc Receptors, *Science*, **234**, 718—725.
1203. *Raymond L., Slatin S.L., Finkelstein A., Liu O.-R., Levinthal C.* (1986). Gating of a Voltage-Dependent Channel (Colicin E1) in Planar Lipid Bilayers: Translocation of Regions Outside the Channel-Forming Domain, *J. Membrane Biol.*, **92**, 255—268.
1204. *Rebecchi M.J., Rosen O.M.* (1987). Purification of a Phosphoinositide-specific Phospholipase C from Bovine Brain, *J. Biol. Chem.*, **262**, 12 526—12 532.
1205. *Rechsteiner M., Rogers S., Rote K.* (1987). Protein Structure and Intercellular Stability, *TIBS*, **12**, 390—394.
1206. *Recny M.A., Grabau C., Cronan J.E., Jr., Hager L.P.* (1985). Characterization of the α -Peptide Released upon Protease Activation of Pyruvate Oxidase, *J. Biol. Chem.*, **260**, 14 287—14 291.
1207. *Reed P.W.* (1979). Tonophores, *Methods in Enz.*, **55**, 435—454.
1208. *Rehorek M., Dencher N.A., Heyn M.P.* (1985). Long-Range Lipid-Protein Interactions. Evidence from Time-Resolved Fluorescence Depolarization and Energy-Transfer Experiments with Bacteriorhodopsin-Dimyristoylphosphatidylcholine Vesicles, *Biochemistry*, **24**, 5980—5988.
1209. *Reid E., Williamson R.* (1974). Centrifugation. *Methods in Enz.*, **31**, 713—733.
1210. *Renetseder R., Brunie S., Dijkstra B.W., Drenth J., Sigler P.B.* (1985). A Comparison of the Crystal Structures of Phospholipase A2 from Bovine Pancreas and *Crotalus atrox* Venom, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11 627—11 634.
1211. *Reynolds J.A., Tanford C.* (1970). Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**, 1002—1007.
1212. *Reynolds J.A., Gilbert D.B., Tanford C.* (1974). Empirical Correlation Between Hydrophobic Free Energy and Aqueous Cavity Surface Area, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2925—2927.
1213. *Reynolds J.A., McCaslin D.R.* (1985). Determination of Protein Molecular Weights in Complexes with Detergents without Knowledge of Binding, *Methods in Enz.*, **117**, 41—53.
1214. *Reynolds J.A., Nozaki Y., Tanford C.* (1983). Gel-Exclusion Chromatography on Si1000 Sephacryl: Application to Phospholipid Vesicles, *Anal. Biochem.*, **130**, 471—474.
1215. *Rich G.T., Pryor J.S., Dawson A.P.* (1985). Lack of Binding of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase to Erythrocyte Membranes under In Vivo Conditions, *Biochim. Biophys. Acta*, **817**, 61—66.
1216. *Richardson S.H., Hultin H.O., Fleischer S.* (1964). Interactions of Mitochondrial Structural Protein with Phospholipids, *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 254—260.
1217. *Riedel N., Fasold H.* (1987). Nuclear-Envelope Vesicles as a Model System to Study Nucleocytoplasmic Transport, *Biochem. J.*, **241**, 213—219.
1218. *Riezman H.* (1985). Endocytosis in Yeast: Several of the Yeast Secretory Mutants Are Defective in Endocytosis, *Cell*, **40**, 1001—1009.
1219. *Rilfors L.* (1985). Difference in Packing Properties between Iso and Anteiso Methyl-branched Fatty Acids as Revealed by Incorporation into the Membrane Lipids of *Acholeplasma laidlawii* Strain A, *Biochim. Biophys. Acta*, **813**, 151—160.
1220. *Ringwald M., Schuh R., Vestweber D., Eistetter H., Lottspeich F., Engel J., Dolz R., Jahnig F., Epplen J., Mayer S., Muller C., Kemler R.* (1987). The Structure of Cell Adhesion Molecule Uvomorulin. Insights into the Molecular Mechanism of Ca^{2+} -dependent Cell Adhesion, *The EMBO Journal*, **6**, 3647—3653.
1221. *Rivnay B., Fischer G.* (1986). Phospholipid Distribution in the Microenvironment of the Immunoglobulin E-Receptor from Rat Basophilic Leukemia Cell Membrane, *Biochemistry*, **25**, 5686—5693.
1222. *Rivnay B., Rossi G., Henkart M., Metzger H.* (1984). Reconstitution of the Receptor for Immunoglobulin E into Liposomes, *J. Biol. Chem.*, **259**, 1212—1217.
1223. *Rizzo V., Stankowski S., Schwarz G.* (1987). Alamethicin Incorporation in Lipid Bilayers: A Thermodynamic Study, *Biochemistry*, **26**, 2751—2759.
1224. *Roman L.M., Garoff H.* (1985). Revelation through Exploitation: The Viral Model for Intracellular Traffic, *TIBS*, **10**, 428—432.
1225. *Roberts B.L., Richardson W.D., Smith A.E.* (1987). The Effect of Protein Context on Nuclear Location Signal Function, *Cell*, **50**, 465—475.
1226. *Roberts D.D., Rao C.N., Liotta L.A., Gralnick H.R., Ginsburg V.* (1986). Comparison of the Specificities of Laminin, Thrombospondin, and von Willebrand Factor for Binding to Sulfated Glycolipids, *J. Biol. Chem.*, **261**, 6872—6877.
1227. *Roberts R.H., Barchi R.L.* (1987). The Voltage-sensitive Sodium Channel from Rabbit Skeletal Muscle: Chemical Characterization of Subunits, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2298—2303.
1228. *Robertson D.E., Rottenberg H.* (1983). Membrane Potential and Surface Potential in Mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **258**, 11 039—11 048.
1229. *Robertson J.D.* (1960). The Molecular Structure and Contact Relationships of Cell Membranes, *Progress in Biophysics*, **343**—418.
1230. *Robertson J.D.* (1966). Granulo-Fibrillar and Globular Substructure in Unit Membranes, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **137**, 421—440.

1231. *Robertson J.D.* (1959). The Ultrastructure of Cell Membranes and Their Derivatives, Biochemical Society Symposium, **16**, 3—43.
1232. *Robillard G.T., Beechey R.B.* (1986). Evidence for the Existence of a Channel in the Glucose-Specific Carrier ElIGlc of the *Salmonella typhimurium* Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System, *Biochemistry*, **25**, 1346—1354.
1233. *Robinson A., Kaderbhai M.A., Austen B.M.* (1987). Identification of Signal Sequence Binding Proteins Integrated into the Rough Endoplasmic Reticulum Membrane, *Biochem. J.*, **242**, 767—777.
1234. *Rock C.O.* (1984). Turnover of Fatty Acids in the 1-Position of Phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **259**, 6188—6194.
1235. *Rock C.O., Cronan J.E.* (1985). Lipid Metabolism in Prokaryotes, *Biochemistry of Lipids and Membranes* (D.E. Vance and J.E. Vance, Eds.), pp. 73—115, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California.
1236. *Rogalski A.A., Singer S.J.* (1985). An Integral Glycoprotein Associated with the Membrane Attachment Sites of Actin Microfilaments, *J. Cell Biol.*, **101**, 785—801.
1237. *Rogers M.J., Strittmatter P.* (1974). Evidence for Random Distribution and Translational Movement of Cytochrome b_5 in Endoplasmic Reticulum *J. Biol. Chem.*, **249**, 895—900.
1238. *Rogers M.J., Strittmatter P.* (1975). The Interaction of NADH-Cytochrome b_5 Reductase and Cytochrome b_5 Bound to Egg Lecithin Liposomes, *J. Biol. Chem.*, **250**, 5713—5718.
1239. *Roise D., Horvath S.J., Tomich J.M., Richards J.H., Schatz G.* (1986). A Chemically Synthesized Pre-sequence of an Imported Mitochondrial Protein Can Form an Amphiphilic Helix and Perturb Natural and Artificial Phospholipid Bilayers, *The EMBO Journal*, **5**, 1327—1334.
1240. *Roman L.M., Garoff H.* (1985). Revelation through Exploitation: The Viral Model for Intracellular Traffic, *TIBS*, **40**, 428—432.
1241. *Ronson C.W., Nixon B.T., Ausubel F.M.* (1987). Conserved Domains in Bacterial Regulatory Proteins That Respond to Environmental Stimuli, *Cell*, **49**, 579—581.
1242. *Rosevear P., VanAken T., Baxter J., Ferguson-Miller S.* (1980). Alkyl Glycoside Detergents: A Simpler Synthesis and Their Effects on Kinetic and Physical Properties of Cytochrome c Oxidase, *Biochemistry*, **19**, 4108—4115.
1243. *Ross A.F., Rapuano M., Schmidt J.H., Prives J.M.* (1987). Phosphorylation and Assembly of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in Cultured Chick Muscle Cells, *J. Biol. Chem.*, **262**, 14 640—14 647.
1244. *Roth G.J., Titani K., Hoyer L.W., Hickey M.J.* (1986). Localization of Binding Sites within Human von Willebrand Factor for Monomeric Type III Collagen, *Biochemistry*, **25**, 8357—8361.
1245. *Roth J.* (1987). Subcellular Organization of Glucosylation in Mammalian Cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 405—436.
1246. *Rothenberg P., Glaser L., Schlesinger P., Cassel D.* (1983). Activation of Na^+/H^+ Exchange by Epidermal Growth Factor Elevates Intracellular pH in A431 Cells, *J. Biol. Chem.*, **258**, 12 644—12 653.
1247. *Rothenberg S., Iacopetta B.J., Kuhn L.C.* (1987). Endocytosis of the Transferrin Receptor Requires the Cytoplasmic Domain but Not Its Phosphorylation Site, *Cell*, **49**, 423—431.
1248. *Rothman J.* (1981). The Golgi Apparatus: Two Organelles in Tandem, *Science*, **213**, 1212—1219.
1249. *Rothman J.E.* (1987). Protein Sorting by Selective Retention in the Endoplasmic Reticulum and Golgi Stack, *Cell*, **50**, 521—522.
1250. *Rothman J.E.* (1987). Transport of the Vesicular Stomatitis Glycoprotein to trans Golgi Membranes in a Cell-free System., *J. Biol. Chem.*, **262**, 12 502—12 510.
1251. *Rothman J.E., Kennedy E.P.* (1977). Rapid Transmembrane Movement of Newly Synthesized Phospholipids During Membrane Assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1821—1825.
1252. *Rothman J.E., Kornberg R.D.* (1986). An Unfolding Story of Protein Translocation, *Nature*, **322**, 209—210.
1253. *Rothman J.E., Schmid S.L.* (1986). Enzymatic Recycling of Clathrin from Coated Vesicles, *Cell*, **46**, 5—9.
1254. *Rothman J.E.* (1986). Life without Clathrin, *Nature*, **319**, 96—97.
1255. *Rottenberg H.* (1984). Membrane Potential and Surface Potential in Mitochondria: Uptake and Binding of Lipophilic Cations, *J. Membrane Biol.*, **81**, 127—138.
1256. *Rottenberg H., Steiner-Mordoch S.* (1986). Free Fatty Acids Decouple Oxidative Phosphorylation by Dissipating Intramembranal Protons without Inhibiting ATP Synthesis Driven by the Proton Electrochemical Gradient, *FEBS Lett.*, **202**, 314—318.
1257. *Rouser G.* (1983). Membrane Composition, Structure, and Function, *Membrane Fluidity in Biology* (R.C. Aloia, Ed.), Vol. **1**, pp. 235—289, Academic Press, New York.
1258. *Rozengurt E.* (1986). Early Signals in the Mitogenic Response, *Science*, **234**, 161—166.
1259. *Ruigrok R.W.H., Wrigley N.G., Calder L.J., Cusack S., Wharton S.A., Brown E.B., Skehel J.J.* (1986). Electron Microscopy of the Low pH Structure of Influenza Virus Haemagglutinin, *The EMBO Journal*, **5**, 41—49.
1260. *Runswick M.J., Powell S.J., Nyren P., Walker J.E.* (1987). Sequence of the Bovine Mitochondrial Phosphate Carrier Protein: Structural Relationship to ADP/ATP Translocase and the Brown Fat Mitochondria Uncoupling Protein, *The EMBO Journal*, **6**, 1367—1373.
1261. *Ruoslahti E., Pierschbacher M.D.* (1987). New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins, *Science*, **238**, 491—497.
1262. *Russel N.J.* (1984). Mechanisms of Thermal Adaptation in Bacteria: Blueprints for Survival, *TIBS*, **9**, 108—112.
1263. *Russell P., Schrock H.L., Gennis R.B.* (1977). Lipid Activation and Protease Activation of Pyruvate Oxidase: Evidence Suggesting a Common Site of Interaction on the Protein, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7883—7887.
1264. *Russo A.F., Koshland D.E.* (1983). Separation of Signal Transduction and Adaptation Functions of the Aspartate Receptor in Bacterial Sensing, *Science*, **220**, 1016—1020.
1265. *Ryba N.J.P., Horvath L.I., Watts A., Marsh D.* (1987). Molecular Exchange at the Lipid-Rhodopsin Interface: Spin-Label Electron Spin Resonance Studies of Rhodopsin-Dimyristoylphosphatidylcholine Recombinants, *Biochemistry*, **26**, 3234—3240.
1266. *Ryu S.H., Cho K.S., Lee K.-Y., Suh P.-G., Rhee S.G.* (1987). Purification and Characterization of Two Immunologically Distinct Phosphoinositide-specific Phospholipase C from Bovine Brain, *J. Biol. Chem.*, **262**, 12 511—12 518.
1267. *Rzebecki L.M., Strittmatter P., Herbert L.G.* (1986). X-ray Diffraction Analysis of Cytochrome b_5 Reconstituted in Egg Phosphatidylcholine Vesicles, *Biophys. J.*, **49**, 829—838.
1268. *Sabatini D.D., Kreibich G., Morimoto T., Adesnik M.* (1982). Mechanisms for the Incorporation of Proteins in Membranes and Organelles, *J. Cell Biol.*, **92**, 1—22.
1269. *Sackmann E.* (1983). Physical Foundations of the Molecular Organization and Dynamics of Membranes, *Biophysics* (Walter Hoppe, Wolfgang Lohmann, Hubert Markl, and Hubert Ziegler, Eds.), pp. 425—457, Springer-Verlag, New York.
1270. *Sackmann E.* (1984). Physical Basis of Trigger Processes and Membrane Structures, *Biological Membranes* (D. Chapman, Ed.), Vol. **5**, pp. 105—143, Academic Press, New York.
1271. *Sackmann E., Kotulla R., Heisler F.-J.* (1984). On the Role of Lipid Bilayer Elasticity

- for the Lipid-Protein Interaction and the Indirect Protein-Protein Coupling, *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **62**, 778—788.
1272. *Safa A.R., Glover C.J., Sewell J.L., Meyers M.B., Biedler J.L., Felsted R.L.* (1987). Identification of the Multidrug Resistance-related Membrane Glycoprotein as an Acceptor for Calcium Channel Blockers, *J. Biol. Chem.*, **262**, 7884—7888.
 1273. *Saffman P.G., Delbrück M.* (1975). Brownian Motion in Biological Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3111—3113.
 1274. *Sakaguchi M., Mihara K., Sato R.* (1987). A Short Amino-Terminal Segment of Microsomal Cytochrome P-450 Functions Both as an Insertion Signal and as a Stop-Transfer Sequence, *The EMBO Journal*, **6**, 2425—2431.
 1275. *Samelson L.E., Harford J.B., Klausner R.D.* (1985). Identification of the Components of the Murine T Cell Antigen Receptor Complex, *Cell*, **43**, 223—231.
 1276. *Sandermann H., Gottwald B.A.* (1983). Cooperative Lipid Activation of $(Na^+ + K^+)$ -ATPase as a Consequence of Non-Cooperative Lipid-Protein Interactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **732**, 332—335.
 1277. *Sandermann H., McIntyre J.O., Fleischer S.* (1986). Site-Site Interaction in the Phospholipid Activation of D- β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **261**, 6201—6208.
 1278. *Sandermann H.* (1978). Regulation of Membrane Enzymes by Lipid, *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 209—237.
 1279. *Sandermann H.* (1982). Lipid-Dependent Membrane Enzymes: A Kinetic Model for Cooperative Activation in the Absence of Cooperativity in Lipid Binding, *Eur. J. Biochem.*, **127**, 123—128.
 1280. *Sandermann H.* (1983). Lipid Solvation and Kinetic Cooperativity of Functional Membrane Proteins, *TIBS*, **8**, 408—411.
 1281. *Saraste M., Penttilä T., Wikström M.* (1981). Quaternary Structure of Bovine Cytochrome Oxidase, *Eur. J. Biochem.*, **115**, 261—268.
 1282. *Sarges R., Witkop B.* (1965). Gramicidin A. V. The Structure of Valine- and Isoleucine-Gramicidin A, *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 2011—2020.
 1283. *Sasaki K., Sato M.* (1987). A Single GTP-binding Protein Regulates K^+ -Channels Coupled with Dopamine, Histamine and Acetylcholine Receptors, *Nature*, **325**, 259—262.
 1284. *Sasaki T.* (1985). Glycolipid-binding Proteins, *Chem. Phys. Lipids*, **38**, 63—77.
 1285. *Saxton M.J.* (1982). Lateral Diffusion in an Archipelago: Effects of Impermeable Patches on Diffusion in a Cell Membrane, *Biophys. J.*, **39**, 165—173.
 1286. *Scarborough G.A.* (1985). Binding Energy, Conformational Change, and the Mechanisms of Transmembrane Solute Movements, *Microbiological Reviews*, **49**, 214—231.
 1287. *Scharschmidt B.F., Lake J.R., Renner E.L., Licko V., Van Dyke R.W.* (1986). Fluid Phase Endocytosis by Cultured Rat Hepatocytes and Perfused Rat Liver: Implications for Plasma Membrane Turnover and Vesicular Trafficking of Fluid Phase Markers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9488—9492.
 1288. *Schatz G.* (1986). A Common Mechanism for Different Membrane Systems? *Nature*, **321**, 108—109.
 1289. *Schatz G.* (1987). Signal Guiding Proteins to Their Correct Locations in Mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, **165**, 1—6.
 1290. *Schauer R.* (1985). Sialic Acids and Their Role as Biological Masks, *TIBS*, **10**, 357—360.
 1291. *Schekman R.* (1985). Protein Transport—It's What's Up Front that Counts, *TIBS*, **10**, 177.
 1292. *Schenkman S., Tsugita A., Schwartz M., Rosenbusch J.P.* (1984). Topology of Phage Lambda Receptor Protein: Mapping Targets of Proteolytic Cleavage in Relation to Binding Sites for Phage or Monoclonal Antibodies, *J. Biol. Chem.*, **259**, 7570—7576.
 1293. *Scherer P.G., Seeling J.* (1987). Structure and Dynamics of the Phosphatidylcholine and the Phosphatidylethanolamine Head Group in L-M Fibroblasts as Studied by Deuterium Nuclear Magnetic Resonance, *The EMBO Journal*, **6**, 2915—2922.
 1294. *Schiffer M., Edmundson A.B.* (1967). Use of Helical Wheels to Represent the Structures of Proteins and to Identify Segments with Helical Potential, *Biophys. J.*, **7**, 121—135.
 1295. *Schlegel R., Wade M.* (1984). A Synthetic Peptide Corresponding to the NH_2 Terminus of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Is a pH-Dependent Hemolysin, *J. Biol. Chem.*, **259**, 4691—4694.
 1296. *Schleifer K.H., Stackerbandt E.* (1983). Molecular Systematics of Prokaryotes, *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 143—187.
 1297. *Schlenstedt G., Zimmermann R.* (1987). Import of Frog Prepropeptide GLa into Mitochondria Requires ATP but Does Not Involve Docking Protein or Ribosomes, *The EMBO Journal*, **6**, 699—703.
 1298. *Schleyer M., Neupert W.* (1985). Transport of Proteins into Mitochondria: Translocational Intermediates Spanning Contact Sites between Outer and Inner Membranes, *Cell*, **43**, 339—350.
 1299. *Schmidt F.O., Bear R.S., Clark G.* (1935). X-ray Diffraction Studies on Nerve, *Radiology*, **25**, 131—151.
 1300. *Schmidt J.W., Catterall W.A.* (1987). Palmitoylation, Sulfation, and Glycosylation of the α Subunit of the Sodium Channel, *J. Biol. Chem.*, **262**, 13 713—13 723.
 1301. *Schneider E., Altendorf K.* (1985). All Three Subunits Are Required for the Reconstitution of an Active Proton Channel (F_0) of *Escherichia coli* ATP Synthase (F_1F_0), *The EMBO Journal*, **4**, 515—518.
 1302. *Schofield P.R., Darlison M.G., Fujita N., Burt D.R., Stephenson F.A., Rodriguez H., Rhee L.M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T.A., Seeburg P.H., Barnard E.A.* (1987). Sequence and Functional Expression of the GABA Receptor Shows a Ligand-gated Receptor Super-family, *Nature*, **328**, 221—227.
 1303. *Schreier S., Polnaszek C.F., Smith I.C.* (1978). Spin Labels in Membranes: Problems in Practice, *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 395—436.
 1304. *Schrock H.L., Gennis R.B.* (1977). High Affinity Lipid Binding Sites on the Peripheral Membrane Enzyme Pyruvate Oxidase, *J. Biol. Chem.*, **252**, 5990—5995.
 1305. *Schulz G.E., Schirmer R.H.* (1979). Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York.
 1306. *Schurtenberger P., Hauser H.* (1984). Characterization of the Size Distribution of Unilamellar Vesicles by Gel Filtration, Quasielastic Light Scattering and Electron Microscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **778**, 470—480.
 1307. *Schwaiger M., Herzog V., Neupert W.* (1987). Characterization of Translocation Contact Sites Involved in the Import of Mitochondrial Proteins, *J. Cell Biol.*, **105**, 235—246.
 1308. *Scopes R.K.* (1982). Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York.
 1309. *Scott S., Pendlebury S.A., Green C.* (1984). Lipid Organization in Erythrocyte Membrane Microvesicles, *Biochem. J.*, **224**, 285—290.
 1310. *Scotto A.W., Zakim D.* (1985). Reconstitution of Membrane Proteins. Spontaneous Association of Integral Membrane Proteins with Preformed Unilamellar Lipid Bilayers, *Biochemistry*, **24**, 4066—4075.
 1311. *Scotto A.W., Zakim D.* (1986). Reconstitution of Membrane Proteins: Catalysis by Cholesterol of Insertion of Integral Membrane Proteins into Preformed Lipid Bilayers, *Biochemistry*, **25**, 1555—1561.
 1312. *Scoulica E., Krause E., Meese K., Dobberstein B.* (1987). Disassembly and Domain Structure of the Proteins in the Signal-recognition Particle, *Eur. J. Biochem.*, **163**, 519—528.

1313. Scullion B.F., Hou Y., Puddington L., Rose J.K., Jacobson K. (1987). Effects of Mutations in Three Domains of the Vesicular Stomatitis Viral Glycoprotein on Its Lateral Diffusion in the Plasma Membrane, *J. Cell Biol.*, **105**, 69—75.
1314. Seckler R., Moroy T., Wright J.K., Overath P. (1986). Anti-Peptide Antibodies and Proteases as Structural Probes for the Lactose/H⁺ Transporter of *Escherichia coli*: A Loop around Amino Acid Residue 130 Faces the Cytoplasmic Side of the Membrane, *Biochemistry*, **25**, 2403—2409.
1315. Seddon J.M., Cevc G., Kaye R.D., Marsh D. (1984). X-ray Diffraction Study of the Polymorphism of Hydrated Diacyl and Dialkylphosphatidylethanolamines, *Biochemistry*, **23**, 2634—2644.
1316. Seed B. (1987). An LFA-3 cDNA Encodes a Phospholipid-linked Membrane Protein Homologous to Its Receptor CD2, *Nature*, **329**, 840—842.
1317. Seelig A., Seelig J. (1985). Phospholipid Composition and Organization of Cytochrome c Oxidase Preparations as Determined by ³¹P-Nuclear Magnetic Resonance, *Biochim. Biophys. Acta*, **815**, 153—158.
1318. Seelig J. (1978). Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance and the Headgroup Structure of Phospholipids in Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 105—141.
1319. Seelig J. (1977). Deuterium Magnetic Resonance: Theory and Application to Lipid Membranes, *Quart. Rev. Biophys.*, **10**, 353—415.
1320. Seelig J., Seelig A. (1980). Lipid Conformation in Model Membranes and Biological Membranes, *Quart. Rev. Biophys.*, **13**, 19—61.
1321. Seelig J., Browning J.L. (1978). General Features of Phospholipid Conformation in Membranes, *FEBS Lett.*, **92**, 41—44.
1322. Sefton B.M., Buss J.E. (1987). The Covalent Modification of Eukaryotic Proteins with Lipid, *J. Cell Biol.*, **104**, 1449—1453.
1323. Segrest J.P., Kahane T., Jackson R.L., Marchesi V.T. (1973). Major Glycoprotein of the Human Erythrocyte Membrane: Evidence for an Amphipathic Structure, *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 167—183.
1324. Seiff F., Westerhausen J., Wallat I., Heyn M.P. (1986). Location of the Cyclohexene Ring of the Chromophore of Bacteriorhodopsin by Neutron Diffraction with Selectively Deuterated Retinal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7746—7750.
1325. Seigneuret M., Rigaud J.-L. (1986). Analysis of Passive and Light-Driven Ion Movements in Large Bacteriorhodopsin Liposomes Reconstituted by Reverse-Phase Evaporation. 1. Factors Governing the Passive Proton Permeability of the Membrane, *Biochemistry*, **25**, 6716—6722.
1326. Semin B.K., Saraste M., Wikstrom M. (1984). Calorimetric Studies of Cytochrome Oxidase-Phospholipid Interactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 15—22.
1327. Serrano R., Kielland-Brandt M.C., Fink G.R. (1986). Yeast Plasma Membrane ATPase Is Essential for Growth and Has Homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases, *Nature*, **319**, 693—699.
1328. Sessa G., Freer J.H., Colacicco G., Weissmann G. (1969). Interactions of a Lytic Polypeptide Melittin with Lipid Membrane Systems, *J. Biol. Chem.*, **244**, 3575—3582.
1329. Severs N.J., Robenek H. (1983). Detection of Microdomains in Biomembranes: An Appraisal of Recent Developments in Freeze-Fracture Cytochemistry, *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 373—408.
1330. Sharon N. (1987). Bacterial Lectins, Cell-Cell Recognition and Infectious Disease, *FEBS Lett.*, **217**, 145—157.
1331. Sheetz M., Schindler M., Koppel D.E. (1980). Lateral Mobility in Integral Membrane Proteins Increased in Spherocytic Erythrocytes, *Nature*, **285**, 510—512.
1332. Shimada K., Murata N. (1976). Chemical Modification by Trinitrobenzene-sulfonate of a Lipid and Protein of Intracytoplasmic Membranes Isolated from *Chromatium vinosum* and *Azotobacter vinlandii* *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 605—620.
1333. Shinitzky M. (1984). Membrane Fluidity and Cellular Functions, *Physiology of Membrane Fluidity* (M. Shinitzky, Ed.), Vol. 1, pp. 1—51, CRC Press, Boca Raton.
1334. Shipley G.G. (1973). Recent X-ray Diffraction Studies of Biological Membrane Components, *Biological Membranes* (D. Chapman and D.F.H. Wallach, Eds.), Vol. 2, pp. 1—89, Academic Press, New York.
- 1334a. Shipley G.G., Green J.P., Nichols B.W. (1973). The Phase Behavior of Monogalactosyl, Digalactosyl, and Sulphoquinovosyl Diglycerides, *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 531—544.
1335. Shirayoshi Y., Hatta K., Hosoda M., Tsunasawa S., Sakiyama F., Tukeichi M. (1986). Cadherin Cell Adhesion Molecules with Distinct Binding Specificities Share a Common Structure, *The EMBO Journal*, **5**, 2485—2488.
1336. Shreeve S.M., Roeske W.R., Venter J.C. (1984). Partial Functional Reconstitution of the Cardiac Muscarinic Cholinergic Receptor, *J. Biol. Chem.*, **259**, 12 398—12 402.
1337. Shull G.E., Schwarz A., Lingrel J.B. (1985). Amino-acid Sequence of the Catalytic Subunit of the (Na⁺ + K⁺)ATPase Deduced from a Complementary DNA, *Nature*, **316**, 691—695.
1338. Shull G.E., Lane L.K., Lingrel J.B. (1986). Amino-acid Sequence of the β -Subunit of the (Na⁺ + K⁺)ATPase Deduced from a cDNA, *Nature*, **321**, 429—431.
1339. Siegelman M., Bond M.W., Gallatin W.M., John T.St., Smith H.T., Fried V.A., Weissman I.L. (1986). Cell Surface Molecule Associated with Lymphocyte Homing Is a Ubiquitinated Branched-Chain Glycoprotein, *Science*, **231**, 823—829.
1340. Sibley D.R., Benovic J.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1987). Regulation of Transmembrane Signalling by Receptor Phosphorylation, *Cell*, **48**, 913—922.
1341. Silversmith R.E., Nelsestuen G.L. (1986). Assembly of the Membrane Attack Complex of Complement on Smaller Unilamellar Phospholipid Vesicles, *Biochemistry*, **25**, 825—860.
1342. Silvius J.R., McMillen D.A., Saley N.D., Jost P.C., Griffith O.H. (1984). Competition between Cholesterol and Phosphatidylcholine for the Hydrophobic Surface of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase *Biochemistry*, **23**, 538—547.
1343. Silvius J.R., Leventis R., Brown P.M., Zuckermann M. (1987). Novel Fluorescent Phospholipids for Assays of Lipid Mixing between Membranes, *Biochemistry*, **26**, 4279—4287.
1344. Simmonds A.C., Rooney E.K., Lee A.G. (1984). Interactions of Cholesterol Hemisuccinate with Phospholipids and (Ca²⁺ — Mg²⁺)-ATPase, *Biochemistry*, **23**, 1432—1441.
1345. Simon K., Perara E., Lingappa V.R. (1987). Translocation of Globin Fusion Proteins across the Endoplasmic Reticulum Membrane in *Xenopus laevis* Oocytes, *J. Cell Biol.*, **104**, 1165—1172.
1346. Simon S.A., McIntosh T.J. (1984). Interdigitated Hydrocarbon Chain Packing Causes the Biphasic Transition Behavior in Lipid/Alcohol Suspensions, *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 169—172.
1347. Simons K., Garoff H., Helenius A. (1977). The Glycoproteins of the Semliki Forest Virus Membrane, *Membrane Proteins and Their Interaction with Lipids* (R.A. Capaldi, Ed.), pp. 207—234, Marcel Dekker, Inc., New York.
1348. Singer S.J. (1974). The Molecular Organization of Membranes, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 805—833.
1349. Singer S.J., Nicolson G.L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science*, **175**, 720—731.
1350. Singer S.J., Maher P.A., Yaffe M.P. (1987). On the Transfer of Integral Proteins into Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1960—1964.

1351. Sixl F., Brophy P.J., Watts A. (1984). Selective Protein-Lipid Interactions at Membrane Surfaces: A Deuterium and Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance Study of the Association of Myelin Basic Protein with the Bilayer Head Groups of Dimyristoylphosphatidylcholine and Dimyristoylphosphatidylglycerol, *Biochemistry*, **23**, 2032—2039.
1352. Sjostrom M., Wold S., Wieslander A., Rilfors L. (1987). Signal Peptide Amino Acid Sequences in *Escherichia coli* Contain Information Related to Final Protein Localization, A Multivariate Data Analysis, *The EMBO Journal*, **6**, 823—831.
1353. Slocum M.K., Halden N.F., Parkinson J.S. (1987). Hybrid *Escherichia coli* Sensory Transducers with Altered Stimulus Detection and Signaling Properties, *J. Bacteriology*, **169**, 2938—2944.
1354. Smaal E.B., Nicolay K., Mandersloot J.G., de Gier J., de Kruijff B. (1987). ^2H -NMR, ^{31}P -NMR and DSC Characterization of a Novel Lipid Organization in Calcium-di-oleoylphosphatide Membranes. Implications for the Mechanism of the Phosphatidate Calcium Transmembrane Shuttle, *Biochim. Biophys. Acta*, **897**, 453—466.
1355. Smalheiser N.R., Schwartz N.B. (1987). Cranin: A Laminin-binding Protein of Cell Membranes, *Roc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6457—6461.
1356. Smeeckens S., Bauerle C., Hageman J., Keegstra K., Wiesbeck P. (1986). The Role of the Transit Peptide in the Routing of Precursors toward Different Chloroplast Compartments, *Cell*, **46**, 365—375.
1357. Smigel M., Fleischer S. (1977). Characterization of Triton X-100-solubilized Prostaglandin E. Binding Protein of Rat Liver Plasma Membranes, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3689—3696.
1358. Smith C., Phillips M., Miller C. (1986). Purification of Charybdotoxin, a Specific Inhibitor of the High-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} Channel, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14 607—14 613.
1359. Smith M.M., Lindstrom J., Merlie J.P. (1987). Formation of the α -Bungarotoxin Binding Site and Assembly of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits Occur in the Endoplasmic Reticulum, *J. Biol. Chem.*, **262**, 4367—4376.
1360. Smith R.L., Oldfield E. (1984). Dynamic Structure of Membranes by Deuterium NMR, *Science*, **225**, 280—288.
1361. Snoek G.T., Rosenberg I., de Laat S.W., Gitler C. (1986). The Interaction of Protein Kinase C and Other Specific Cytoplasmic Proteins with Phospholipid Bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 336—344.
1362. Solioz M., Mathews S., Furst P. (1987). Cloning of the K^{+} -ATPase of *Streptococcus faecalis*: Structural and Evolutionary Implications of Its Homology to the KdpB-Protein of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **262**, 7358—7362.
1363. Sowers A.E., Hackenbrock C.R. (1985). Variatin in Protein Lateral Diffusion Coefficients Is Related to Variation in Protein Concentration Found in Mitochondrial Inner Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **821**, 85—90.
1364. Sowers A.E., Lieber M.R. (1986). Electropore Diameters, Lifetimes, Numbers, and Locations in Individual Erythrocyte Ghosts, *FEBS Lett.*, **205**, 179—184.
1365. Sparrow C.P., Ganong B.R., Raetz C.R.H. (1984). *Escherichia coli* Membrane Vesicles with Elevated Phosphatidic Acid Levels, *Biochim. Biophys. Acta*, **794**, 373—383.
1366. Sparrow C.P., Raetz C.R.H. (1985). Purification and Properties of the Membrane-bound CDP-diglyceride Synthetase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12 084—12 091.
1367. Spiegel S., Fishman P.H. (1985). Direct Evidence That Endogenous GM_1 Ganglioside Can Mediate Thymocyte Proliferation, *Science*, **230**, 1285—1287.
1368. Spiegel S., Fishman P.H. (1987). Gangliosides as Bimodal Regulators of Cell Growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 141—145.
1369. Spiegel S., Blumenthal R., Fishman P.H., Handler J.S. (1985). Gangliosides Do Not Move from Apical to Basolateral Plasma Membrane in Cultural Epithelial Cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **821**, 310—318.
1370. Spiegel S., Kassiss S., Wilchek M., Fishman P.H. (1984). Direct Visualization of Redistribution and Capping of Fluorescent Gangliosides on Lymphocytes, *J. Cell Biol.*, **99**, 1575—1581.
1371. Spiess M., Schwartz A.L., Lodish H.F. (1985). Sequence of Human Asialoglycoprotein Receptor cDNA: An Internal Signal Sequence for Membrane Insertion, *J. Biol. Chem.*, **260**, 1979—1982.
1372. Spiess M., Lodish H.F. (1986). An Internal Signal Sequence: The Asialoglycoprotein Receptor Membrane Anchor, *Cell*, **44**, 177—185.
1373. Squier T.C., Bigelow D.J., Garcia de Ancos J., Inesi G. (1987). Localization of Site-specific Probes on the Ca-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum Using Fluorescence Energy Transfer, *J. Biol. Chem.*, **262**, 4748—4754.
1374. Srere P.A. (1987). Complexes of Sequential Metabolic Enzymes, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 89—124.
1375. Srivastava D.K., Bernhard S.A. (1986). Metabolic Transfer via Enzyme-Enzyme Complexes, *Science*, **234**, 1081—1086.
1376. Stahl N., Jencks W.P. (1987). Reactions of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Adenosinetriphosphatase with Adenosine 5'Triphosphate and Ca^{2+} That Are Not Satisfactorily Described by an E1-E2 Model *Biochemistry*, **26**, 7654—7667.
1377. Stan-Lotter H., Bragg P.D. (1986). Conformational Interactions between α and β Subunits in the F_1 ATPase of *Escherichia coli* as Shown by Chemical Modification of uncA401 and uncD412 Mutant Enzymes, *Eur. J. Biochem.*, **160**, 169—174.
1378. Stankowski S. (1984). Large-Ligand Adsorption to Membranes III. Cooperativity and General Ligand Shapes, *Biochim. Biophys. Acta*, **777**, 167—182.
1379. Stankowski S. (1983). Large-Ligand Adsorption to Membranes I. Linear Ligands as a Limiting Case, *Biochim. Biophys. Acta*, **735**, 341—351.
1380. Stanley K.K., Herz J. (1987). Topological Mapping of Complement Component C9 by Recombinant DNA Techniques Suggests a Novel Mechanism for Its Insertion into Target Membranes, *The EMBO Journal*, **6**, 1951—1957.
1381. Stark W., Kuhlbrandt W., Wildhaber I., Wehrli E., Muhlethaler K. (1984). The Structure of the Photoreceptor Unit of *Rhodospseudomonas viridis*, *The EMBO Journal*, **3**, 777—783.
1382. Staros J.V. (1980). Aryl Azide Photolabels in Biochemistry, *TIBS*, **5**, 320—322.
1383. Steele J.C.H., Jr., Tanford C., Reynolds J.A. (1978). Determination of Partial Specific Volumes for Lipid Associated Proteins, *Methods in Enz.*, **48**, 11—23.
1384. Steffens G.C.M., Biewald R., Buse G. (1987). Cytochrome c Oxidase is a Three-copper, Two-heme-A Protein, *Eur. J. Biochem.*, **164**, 295—300.
1385. Stein M., Zijderhand-Bleekemolen J.E., Geuze H., Hasilik A., von Figura K. (1987). M_r46000 Mannose 6-Phosphate Specific Receptor: its Role in Targeting of Lysosomal Enzymes, *The EMBO Journal*, **6**, 2677—2681.
1386. Stein W.D. (1986). Transport and Diffusion across Cell Membranes, Academic Press, Inc., New York.
1387. Stein W.D., Danielli J.F. (1956). Structure and Function in Red Cell Permeability, *Disc. Faraday Soc.*, **21**, 238—251.
1388. Stephan M.M., Jacobson G.R. (1986). Subunit Interactions of the *Escherichia coli* Mannitol Permease: Correlation with Enzymic Activities, *Biochemistry*, **25**, 4046—4051.
1389. Sternweis P.C. (1986). The Purified α Subunits of G_0 and G_i from Bovine Brain Require $\beta\gamma$ for Association with Phospholipid Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **261**, 631—637.
1390. Stevens C.F. (1986). Are There Two Functional Classes of Glutamate Receptors? *Nature*, **322**, 210—211.

1391. *Stidham M.A., McIntosh T.J., Siedow J.N.* (1984). On the Location of Ubiquinone in Phosphatidylcholine Bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **767**, 423—413.
1392. *Stillinger F.H.* (1980). Water Revisited, *Science*, **209**, 451—457.
1393. *Stock J., Kersulis G., Koshland D.E.* (1985). Neither Methylating nor Demethylating Enzymes Are Required for Bacterial Chemotaxis, *Cell*, **42**, 683—690.
1394. *Stoeckenius W.R., Bogomolni R.A.* (1982). Bacteriorhodopsin and Related Pigments of Halobacteria, *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 587—616.
1395. *Stoorvogel W., Geuze H.J., Strous G.J.* (1987). Sorting of Endocytosed Transferrin and Asialoglycoprotein Occurs Immediately after Internalization in HepG2 Cells, *J. Cell Biol.*, **104**, 1261—1268.
1396. *Strader C.D., Sigall I.S., Register R.B., Candelore M.R., Rands E., Dixon R.A.F.* (1987). Identification of Residues Required for Ligand Binding to the β -Adrenergic Receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4384—4388.
1397. *Strader C.D., Dixon R.A.F., Cheung A.H., Candelore M.R., Blake A.D., Sigal I.S.* (1987). Mutations That Uncouple the β -Adrenergic Receptor from G_i and Increase Agonist Affinity, *J. Biol. Chem.*, **262**, 16 439—16 443.
1398. *Strauch K.L., Kumamoto C.A., Beckwith J.* (1986). Does secA Mediate Coupling between Secretion and Translation in *Escherichia coli*? *J. Bacteriology*, **166**, 505—512.
1399. *Stroud R.M., Finer-Moore J.* (1985). Acetylcholine Receptor Structure, Function, and Evolution, *Ann. Rev. Cell Biol.*, **1**, 317—351.
1400. *Stryer L., Bourne H.R.* (1986). G Proteins: A Family of Signal Transducers, *Ann. Rev. Cell Biol.*, **2**, 391—419.
1401. *Suarez M.D., Revzin A., Narlock R., Kempner E.S., Thompson D.A., Ferguson-Miller S.* (1984). The Functional and Physical Form of Mammalian Cytochrome c Oxidase Determined by Gel Filtration, Radiation Inactivation and Sedimentation Equilibrium Analysis, *J. Biol. Chem.*, **259**, 13 791—13 799.
1402. *Suarez-Isla B.A., Wan K., Lindstrom J., Montal M.* (1983). Single-channel Recordings from Purified Acetylcholine Receptors Reconstituted in Bilayers Formed at the Tip of Patch Pipets, *Biochemistry*, **22**, 2319—2323.
1403. *Subramaniam S., Seul M., McConnell H.M.* (1986). Lateral Diffusion of Specific Antibodies Bound to Lipid Monolayers on Alkylated Substrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1169—1173.
1404. *Sudhof T.C., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D.W.* (1985). The LDL Receptor Gene: A Mosaic of Exons Shared with Different Proteins, *Science*, **228**, 815—822.
1405. *Sugar I.P., Foster W., Neumann E.* (1987). Model of Cell Electrofusion: Membrane Electroporation, Pore Coalescence and Percolation, *Biophys. Chem.*, **26**, 321—335.
1406. *Sumegi B., Srere P.A.* (1984). Complex I Binds Several Mitochondrial NAD-coupled Dehydrogenases, *J. Biol. Chem.*, **259**, 15 040—15 045.
1407. *Sumegi B., Srere P.S.* (1984). Binding of the Enzymes of Fatty Acid β -Oxidation and Some Related Enzymes to Pig Heart Inner Mitochondrial Membrane, *J. Biol. Chem.*, **259**, 8748—8752.
1408. *Sun S.-T., Milon A., Tanaka T., Ourisson G., Nakatani Y.* (1986). Osmotic Swelling of Unilamellar Vesicles by the Stopped-flow Light Scattering Method. Elastic Properties of Vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **860**, 525—530.
1409. *Sundberg S.A., Hubbell W.L.* (1986). Investigation of Surface Potential Asymmetry in Phospholipid Vesicles by a Spin Label Relaxation Method, *Biophys. J.*, **49**, 553—562.
1410. *Sundby C., Larsson C.* (1985). Transbilayer Organization of the Thylakoid Galactolipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **813**, 61—67.
1411. *Sung S.-S., Jordan P.C.* (1987). Why Is Gramicidin Valence Selective? *Biophys. J.*, **51**, 661—672.
1412. *Sunshine J., Balak K., Rutishauser U., Jacobson M.* (1987). Changes in Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Structure During Vertebrate Neural Development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5986—5990.
1413. *Surewicz W.K., Moscarello M.A., Mantsch H.H.* (1987). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Investigation of the Interaction between Myelin Basic Protein and Dimyristoylphosphatidylglycerol Bilayers, *Biochemistry*, **26**, 3881—3886.
1414. *Surewicz W.K., Moscarello M.A., Mantsch H.H.* (1987). Secondary Structure of the Hydrophobic Myelin Protein in a Lipid Environment as Determined by Fourier-transform Infrared Spectrometry, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8598—8602.
1415. *Swanson J.A., Yirinec B.D., Silverstein S.C.* (1985). Phorbol Esters and Horseradish Peroxidase Stimulate Pinocytosis and Redirect the Flow of Pinocytosed Fluid in Macrophages, *J. Cell Biol.*, **100**, 851—859.
1416. *Symington F.W., Murray W.A., Bearman S.I., Hakomori S.* (1987). Intracellular Localization of Lactosylceramide, the Major Human Neutrophil Glycosphingolipid, *J. Biol. Chem.*, **262**, 11 356—11 363.
1417. *Szoka F., Papahadjopoulos D.* (1980). Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes), *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **9**, 467—508.
1418. *Tai S.-P., Kaplan S.* (1985). Intracellular Localization of Phospholipid Transfer Activity in *Rhodospseudomonas sphaeroides* and a Possible Role in Membrane Biogenesis, *J. Bacteriology*, **164**, 181—186.
1419. *Tajima S., Lauffer L., Rath V.L., Walter P.* (1986). The Signal Recognition Particle Receptor Is a Complex That Contains Two Distinct Polypeptide Chains, *J. Cell Biol.*, **103**, 1167—1178.
1420. *Takagaki Y., Radhakrishnam R., Wirtz K.W.A., Khorana H.G.* (1983). The Membrane-embedded Segment of Cytochrome b_5 as Studied by Cross-linking with Photoactivatable Phospholipids: II The Non-transformable Form, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9136—9142.
1421. *Takagaki Y., Radhakrishnan R., Gupta C.M., Khorana H.G.* (1983). The Membrane-embedded Segment of Cytochrome b_5 as Studied by Cross-linking with Photoactivatable Phospholipids. I. The Transferable Form, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9128—9135.
1422. *Takahashi M., Seagar M.J., Jones J.F., Reber B.F.X., Catterall W.A.* (1987). Subunit Structure of Dihydropyridine-sensitive Calcium Channels from Skeletal Muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5478—5482.
1423. *Takemori S., Kominami S.* (1984). The Role of Cytochromes P-450 in Adrenal Steroidogenesis, *TIBS*, **9**, 393—396.
1424. *Tal M., Silberstein A., Nusser E.* (1985). Why Does Coomassie Brilliant Blue R Interact Differently with Different Proteins?: A Partial Answer, *J. Biol. Chem.*, **260**, 9976—9980.
1425. *Talvenheimo J.A.* (1985). The Purification of Ion Channels from Excitable Cells, *J. Membrane Biol.*, **87**, 77—91.
1426. *Tamburini P.P., Gibson G.G.* (1983). Thermodynamic Studies of the Protein-Protein Interactions Between Cytochrome P-450 and Cytochrome b_5 , *J. Biol. Chem.*, **258**, 13 444—13 452.
1427. *Tamburini P.P., Schenkman J.B.* (1987). Purification to Homogeneity and Enzymological Characterization of a Functional Covalent Complex Composed of Cytochromes P-450 Isozyme 2 and b_5 from Rabbit Liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 11—15.
1428. *Tamburini P.P., MacFarquhar S., Schenkman J.B.* (1986). Evidence of Binary Complex Formation Between Cytochrome P-450, Cytochrome b_5 , and NADPH-Cytochrome P-450 Reductase of Hepatic Microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **134**, 519—526.
1429. *Tamkun M.M., Fambrough D.M.* (1986). The $(Na^+ + K^+)$ -ATPase of Chick Sensory

- Neurons: Studies on Biosynthesis and Intracellular Transport, *J. Biol. Chem.*, **261**, 1009—1019.
1430. *Tamm L.K., McConnell H.M.* (1985). Supported Phospholipid Bilayers, *Biophys. J.*, **47**, 105—113.
 1431. *Tanabe T., Takeshima H., Mikami A., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S.* (1987). Primary Structure of the Receptor for Calcium Channel Blockers from Skeletal Muscle, *Nature*, **328**, 313—318.
 1432. *Tanford C.* (1973). The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles in Biological Membranes, John Wiley, New York.
 1433. *Tanford C., Reynolds J.A., Johnson E.A.* (1987). Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump: A Model for Ca^{2+} Binding and Ca^{2+} -coupled Phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7094—7098.
 1434. *Tanford C., Nozaki Y., Rohde M.F.* (1977). Size and Shape of Globular Micelles Formed in Aqueous Solution by n-Alkyl Polyoxyethylene Ethers, *J. Phys. Chem.*, **81**, 1555—1560.
 1435. *Taniguchi H., Imai Y., Sato R.* (1987). Protein-Protein and Lipid-Protein Interactions in a Reconstituted Cytochrome P-450 Dependent Microsomal Monooxygenase, *Biochemistry*, **26**, 7084—7090.
 1436. *Tank D.W., Wu E.-S., Webb W.W.* (1982). Enhanced Molecular Diffusibility in Muscle Membrane Blebs: Release of Lateral Constraints, *J. Cell Biol.*, **92**, 207—212.
 1437. *Tanner L.I., Lienhard G.E.* (1987). Insulin Elicits a Redistribution of Transferrin Receptors in 3T3-L1 Adipocytes through an Increase in the Rate Constant for Receptor Externalization, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8975—8980.
 1438. *Tanner M.J.A.* (1979). Isolation of Integral Membrane Proteins and Criteria for Identifying Carrier Proteins, *Curr. Topics Memb. Transp.*, **12**, 1—51.
 1439. *Taraschi T.F., de Kruijff B., Verkley A., Van Echteld C.J.A.* (1982). Effect of Glycophorin on Lipid Polymorphism: A ^{31}P -NMR Study, *Biochim. Biophys. Acta*, **685**, 153—161.
 1440. *Taylor K.A., Dux L., Martonosi A.* (1986). Three-dimensional Reconstruction of Negatively Stained Crystals of the Ca^{2+} -ATPase from Muscle Sarcoplasmic Reticulum, *J. Mol. Biol.*, **187**, 417—427.
 1441. *Taylor M.G., Smith I.C.P.* (1983). The Conformations of Nitroxide-Labelled Fatty Acid Probes of Membrane Structure as Studied by ^2H -NMR, *Biochim. Biophys. Acta*, **733**, 256—263.
 1442. *Teeters C.L., Eccles J., Wallace B.A.* (1987). A Theoretical Analysis of the Effects of Sonication on Differential Absorption Flattening in Suspensions of Membrane Sheets, *Biophys. J.*, **51**, 527—532.
 1443. *Tempel B.L., Papazian D.M., Schwarz T.L., Jan Y.N., Jan L.Y.* (1987). Sequence of a Probable Potassium Channel Component Encoded at Shaker Locus of *Drosophila*, *Science*, **237**, 770—775.
 1444. *Tenchov B.G., Boyanov A.I., Koynova R.D.* (1984). Lyotropic Polymorphism of Racemic Dipalmitoylphosphatidylethanolamine. A Differential Scanning Calorimetry Study, *Biochemistry*, **23**, 3553—3555.
 1445. *Terwilliger T.C., Weissman L., Eisenberg D.* (1982). The Structure of Melittin in the Form I Crystals and Its Implication for Melittin's Lytic and Surface Activities, *Biophys. J.*, **37**, 353—361.
 1446. *Thiery J.-P., Delouvee A., Grumet M., Edelman G.M.* (1985). Initial Appearance and Regional Distribution of the Neuron-Glia Cell Adhesion Molecule in the Chick Embryo, *J. Cell Biol.*, **100**, 442—456.
 1447. *Thilo L.* (1985). Quantification of Endocytosis-derived Membrane Traffic, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 243—266.
 1448. *Thomas D.D.* (1978). Large-Scale Rotational Motions of Proteins Detected by Electron Paramagnetic Resonance and Fluorescence, *Biophys. J.*, **24**, 439—462.
 1449. *Thompson J.E., Coleman R., Finean J.B.* (1968). Comparative X-ray Diffraction and Electron Microscope Studies of Isolated Mitochondrial Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 405—415.
 1450. *Thompson N.L., McConnell H.M., Burghardt T.P.* (1984). Order in Supported Phospholipid Monolayers Detected by the Dichroism of Fluorescence Excited with Polarized Evanescent Illumination, *Biophys. J.*, **46**, 739—747.
 1451. *Thompson S.L., Burrows R., Laub R.J., Krisans S.K.* (1987). Cholesterol Synthesis in Rat Liver Peroxisomes, *J. Biol. Chem.*, **262**, 17 420—17 425.
 1452. *Thurnhofer H., Gains N., Mutsch B., Hauser H.* (1986). Cholesterol Oxidase as a Structural Probe of Biological Membranes: Its Application to Brush Border-Membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **856**, 174—181.
 1453. *Tilcock C.P.S., Hope M.J., Cullis P.R.* (1984). Influence of Cholesterol Esters of Varying Unsaturation on the Polymorphic Phase Preferences of Egg Phosphatidylethanolamine, *Chem. Phys. Lipid*, **35**, 363—370.
 1454. *Tilcock C.P.S., Cullis P.R., Gruner S.M.* (1986). On the Validity of ^{31}P -NMR Determinations of Phospholipid Polymorphic Phase Behavior, *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 47—56.
 1455. *Tilley L., Cribier S., Roelofsen B., Op den Kamp J.A.F., Van Deenen L.L.M.* (1986). ATP-dependent Translocation of Amino Phospholipids Across the Human Erythrocyte Membrane, *FEBS Lett.*, **194**, 21—27.
 1456. *Tobimatsu T., Fujita Y., Fukuda Y., Tanaka K., Mori Y., Konno T., Mishina M., Numa S.* (1987). Effects of Substitution of Putative Transmembrane Segments on Nicotinic Acetylcholine Receptor Function, *FEBS Lett.*, **222**, 56—62.
 1457. *Tobkes N., Wallace B.A., Bayley H.* (1985). Secondary Structure and Assembly Mechanism of an Oligomeric Channel Protein, *Biochemistry*, **24**, 1915—1920.
 1458. *Tokutomi S., Lew R., Ohnishi S.I.* (1981). Ca^{2+} -Induced Phase Separation in Phosphatidylserine, Phosphatidylethanolamine, and Phosphatidylcholine Mixed Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **643**, 276—282.
 1459. *Tolbert N.E.* (1974). Isolation of Subcellular Organelles of Metabolism on Isopycnic Sucrose Gradients, *Methods in Enz.*, **31**, 734—746.
 1460. *Tomita M., Furthmayr H., Marchesi V.T.* (1978). Primary Structure of Human Erythrocyte Glycophorin A. Isolation and Characterization of Peptides and Complete Amino Acid Sequence, *Biochemistry*, **17**, 4756—4770.
 1461. *Tomita M., Marchesi V.T.* (1975). Amino-acid Sequence and Oligosaccharide Attachment Sites of Human Erythrocyte Glycophorin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2964—2968.
 1462. *Tommassen J., van Tol H., Lugtenberg B.* (1983). The Ultimate Localization of an Outer Membrane Protein of *Escherichia coli* K-12 Is Not Determined by the Signal Sequence, *The EMBO Journal*, **2**, 1275—1279.
 1463. *Toon M.R., Solomon A.K.* (1987). Modulation of Water and Urea Transport in Human Red Cells: Effects of pH and Phloretin, *J. Memb. Biol.*, **99**, 157—164.
 1464. *Toro M., Cerbon J., Arzt E., Alegria G., Alva R., Meas Y., Estrada-O S.* (1987). Formation of Ion-Translocating Oligomers by Nigericin, *J. Memb. Biol.*, **95**, 1—8.
 1465. *Torrissi M.R., Lotti L.V., Pavan A., Migliaccio G., Bonatti S.* (1987). Free Diffusion to and from the Inner Nuclear Membrane of Newly Synthesized Plasma Membrane Glycoproteins, *J. Cell Biol.*, **104**, 733—737.
 1466. *Tran D., Carpentier J.-L., Sawano F., Gorden P., Orci L.* (1987). Ligands Internalized through Coated or Noncoated Invaginations Follow a Common Intracellular Pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7957—7961.
 1467. *Trauble H., Eibl H.* (1974). Electrostatic Effects on Lipid Phase Transitions: Membrane

- Structure and Ionic Environment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 214—219.
1468. *Trehwella J., Popot J.-L., Zaccai G., Engelman D.M.* (1986). Localization of Two Chymotryptic Fragments in the Structure of Renatured Bacteriorhodopsin by Neutron Diffraction, *The EMBO Journal*, **5**, 3045—3049.
 1469. *Trehwella J., Anderson S., Fox R., Gogol E., Khan S., Engelman D., Zaccai C.* (1983). Assignment of Segments of the Bacteriorhodopsin Sequence to Positions in the Structural Map, *Biophys. J.*, **42**, 233—241.
 1470. *Tsien R.W., Hess P., McCleskey E.W., Rosenberg R.L.* (1987). Calcium Channels: Mechanisms of Selectivity, Permeation, and Block, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **16**, 265—290.
 1471. *Tsui F.C., Ojcius D.M., Hubbell W.L.* (1986). The Intrinsic pK_a Values for Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine in Phosphatidylcholine Host Bilayers, *Biophys. J.*, **49**, 459—468.
 1472. *Tsuji A., Ohnishi S.* (1986). Restriction of the Lateral Motion of Band 3 in the Erythrocyte Membrane by the Cytoskeletal Network: Dependence on Spectrin Association State, *Biochemistry*, **25**, 6133—6139.
 1473. *Udagawa T., Unemoto T., Tokuda H.* (1986). Generation of Na^+ Electrochemical Potential by the Na^+ -motive NADPH Oxidase and Na^+ / H^+ Antiport System of a Moderately Halophilic *Vibrio costicola*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 2616—2622.
 1474. *Udgaonkar J.B., Hess G.P.* (1986). Acetylcholine Receptor Kinetics: Chemical Kinetics, *J. Membrane Biol.*, **93**, 93—109.
 1475. *Ueno M., Tanford C., Reynolds J.A.* (1984). Phospholipid Vesicle Formation Using Non-ionic Detergents with Low Monomer Solubility. Kinetic Factors Determine Vesicle Size and Permeability, *Biochemistry*, **23**, 3070—3076.
 1476. *Ullrich A., Gray A., Tam A.E., Yang-Feng T., Tsubokawa M., Collins C., Henzel W., Le Bon T., Kathuria S., Chen E., Jacobs S., Francke U., Ramachandran J., Fujita-Yamaguchi Y.* (1986). Insulin-like Growth Factor I Receptor Primary Structure: Comparison with Insulin Receptor Suggest Structural Determinants That Define Functional Specificity, *The EMBO Journal*, **5**, 2503—2512.
 1477. *Ulrich E.L., Girvin M.E., Cramer W.A., Markley J.L.* (1985). Location and Mobility of Ubiquinones of Different Chain Lengths in Artificial Membrane Vesicles, *Biochemistry*, **24**, 2501—2508.
 1478. *Umbreit J.N., Strominger J.L.* (1973). Relation of Detergent HLB Number to Solubilization and Stabilization of D-alanine Carboxypeptidase from *Bacillus subtilis* Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2997—3001.
 1479. *Unwin N.* (1986). Is There a Common Design for Cell Membrane Channels? *Nature*, **323**, 12—13.
 1480. *Unwin N., Henderson R.* (1984). The Structure of Proteins in Biological Membranes, *Sci. Am.*, **250**, 78—94.
 1481. *Unwin P.N.T., Zampighi G.* (1980). Structure of the Junction between Communicating Cells, *Nature*, **283**, 545—549.
 1482. *Unwin P.N.T., Ennis P.D.* (1984). Two Configurations of a Channel-forming Membrane Protein, *Nature*, **307**, 609—613.
 1483. *Unwin P.N.T., Milligan R.A.* (1982). A Large Particle Associated with the Perimeter of the Nuclear Pore Complex, *J. Cell Biol.*, **93**, 63—75.
 1484. *Urry D.W.* (1971). The Gramicidin A Transmembrane Channel: A Proposed Pi-L,D Helix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 672—676.
 1485. *Valls L.A., Hunter C.P., Rothman J.H., Stevens T.N.* (1987). Protein Sorting in Yeast: The Localization Determinant of Yeast Vacuolar Carboxypeptidase Y Resides in the Propeptide, *Cell*, **48**, 887—897.
 1486. *Van den Bosch H.* (1980). Intracellular Phospholipases A, *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 191—246.
 1486. *van Heeswijk M.P.E., van Os C.H.* (1986). Osmotic Water Permeabilities of Brush Border and Basolateral Membrane Vesicles from Rat Renal Cortex and Small Intestine, *J. Membrane Biol.*, **92**, 183—193.
 1488. *van Hoogevest P., Du Maine A.P.M., de Kruijff B., de Gier L.* (1984). The Influence of Lipid Composition on the Barrier Properties of Band 3-Containing Lipid Vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **777**, 241—252.
 1489. *van Hoogevest P., de Gier J., de Kruijff B.* (1984). Determination of the Size of the Packing Defects in Dimyristoylphosphatidylcholine Bilayers Present at the Phase Transition Temperature, *FEBS Lett.*, **171**, 160—164.
 1490. *van Loon A.P.G.M., Braendli A.W., Pesold-Hurt B., Blank D., Schatz G.* (1987). Transport of Proteins to the Mitochondrial Intermembrane Space: The "Matrix-targeting" and the "Sorting" Domains in the Cytochrome c_1 Presequence, *The EMBO Journal*, **6**, 2433—2439.
 1491. *van Loon A.P.G.M., Schatz G.* (1987). Transport of Proteins to the Mitochondrial Intermembrane Space: The "Sorting" Domain of the Cytochrome c_1 Presequence Is a Stop-Transfer Sequence Specific for the Mitochondrial Inner Membrane, *The EMBO Journal*, **6**, 2441—2448.
 1492. *van Loon D., Berkhout Th.A., Demel R.A., Wirtz K.W.A.* (1985). The Lipid Binding Site of the Phosphatidylcholine Transfer Protein from Bovine Liver, *Chem. Phys. Lipid*, **38**, 29—39.
 1493. *van Meer G.* (1987). Plasma Membrane Cholesterol Pools, *TIBS*, **12**, 375—376.
 1494. *van Meer G., Poorhuis B.J.H.M., Wirtz K.W.A., Op den Kamp J.A.F., Van Deenen L.L.M.* (1980). Transbilayer Distribution and Mobility of Phosphatidylcholine in Intact Erythrocyte Membranes, *Eur. J. Biochem.*, **103**, 283—288.
 1495. *van Meer G., Simons K.* (1986). The Function of Tight Junctions in Maintaining Differences in Lipid Composition between the Apical and the Basolateral Cell Surface Domains of MDCK Cells, *The MBO Journal*, **5**, 1455—1464.
 1496. *van Rijn J.L.M.L., Govers-Riemslog J.W.P., Zwaal R.F.A., Rosing J.* (1984). Kinetic Studies of Prothrombin Activation: Effect of Factor Va and Phospholipids on the Formation of the Enzyme-Substrate Complex, *Biochemistry*, **23**, 4557—4564.
 1497. *Van Steeg H., Oudshoorn P., Van Hell B., Polman J.E.M., Grivell L.A.* (1986). Targeting Efficiency of a Mitochondrial Pre-sequence Is Dependent on the Passenger Protein, *The EMBO Journal*, **5**, 3643—3650.
 1498. *Vance D.E.* (1985). Phospholipid Metabolism in Eucaryotes, *Biochemistry of Lipids and Membranes* (D.E. Vance and J.E. Vance, Eds.), pp. 242—270, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California.
 1499. *Vance D.E., Pelech S.L.* (1984). Enzyme Translocation in the Regulation of Phosphatidylcholine Biosynthesis, *TIBS*, **9**, 17—20.
 1500. *Vandenhoeval F.A.* (1965). Study of Biological Structure at the Molecular Level with Stereomodel Projections. II. The Structure of Myelin in Relation to Other Membrane System, *J. AM. Oil Chemists' So.*, **42**, 481—492.
 1501. *Vanderkooi G., Green D.E.* (1970). Biological Membrane Structure. I. The Protein Crystal Model for Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **66**, 615—621.
 1502. *Vaz W.L.C., Nicksch A., Jahmig F.* (1978). Electrostatic Interactions at Charged Lipid Membranes: Measurement of Surface pH with Fluorescent Lipoid pH Indicators, *Eur. J. Biochem.*, **83**, 299—305.
 1503. *Vaz W.L.C., Goodsaid-Zalduondo F., Jacobson K.* (1984). Lateral Diffusion of Lipids and Proteins in Bilayer Membranes, *FEBS Lett.*, **174**, 199—207.

1504. Vaz W.L.C., Derzko I., Jacobson K.A. (1982). Photobleaching Measurements of the Lateral Diffusion of Lipids and Proteins in Artificial Phospholipid Bilayer Membranes, *Cell Surface Reviews*, **8**, 84—128.
1505. Vaz W.L.C., Clegg R.M., Hallmann D. (1985). Translational Diffusion of Lipids in Liquid Crystalline Phase Phosphatidylcholine Multibilayers, A Comparison of Experiment with Theory, *Biochemistry*, **24**, 781—786.
1506. Verhallen P.F.J., Demel R.A., Zwiers H., Gispens W.H. (1984). Adrenocorticotropin Hormone (ACTH)-Lipid Interactions: Implications for Involvement of Amphipathic Helix Formation, *Biochim. Biophys. Acta*, **775**, 246—254.
1507. Verkleij A.J. (1984). Lipidic Intramembranous Particles. *Biochim. Biophys. Acta*, **779**, 43—63.
1508. Verkleij A.J., Humbel B., Studer D., Muller M. (1985). Lipid Particle Systems Visualized by Thin-section Electron Microscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 591—594.
1509. Verkleij A.J., Ververgaert P.H.J.Th. (1975). The Architecture of Biological and Artificial Membranes as Visualized by Freeze Etching, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **26**, 101—121.
1510. Verkeij A.J., Zwaal R.F.A., Roelofsens b., Comfurius P., Kastelijn D., Van Deenen L.L.M. (1973). The Asymmetric Distribution of Phospholipids in the Human Red Cell Membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 178—193.
1511. Verkman A.S. (1987). Mechanism and Kinetics of Merocyanine 540 Binding to Phospholipid Membranes, *Biochemistry*, **26**, 4050—4056.
1512. Verkman A.S., Skorecki K., Ausiello D.A. (1984). Radiation Inactivation of Oligomeric Enzyme Systems: Theoretical Considerations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 150—154.
1513. Verma S.P., Wallach D.F.H. (1984). Raman Spectroscopy of Lipids and Biomembranes, *Biomembrane Structure and Function* (D. Chapman, Ed.), pp. 167—198, Verlag Chemie, Basel.
1514. Verner K., Schatz G. (1987). Import of an Incompletely Folded Precursor Protein into Isolated Mitochondria Requires an Energized Inner Membrane, but No Added ATP, *The EMBO Journal*, **6**, 2449—2456.
1515. Verselis V., White R.L., Spray D.C., Bennett M.V.L. (1986). Gap Junctional Conductance and Permeability Are Linearly Related, *Science*, **234**, 461—464.
1516. Vigo C., Grossman S.H., Drost-Hansen W. (1984). Interaction of Dolichol and Dolichol Phosphate with Phospholipid Bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **774**, 221—226.
1517. Viitanen P.V., Geiger P.J., Erickson-Viitanen S., Bessman S.P. (1984). Evidence for Functional Hexokinase Compartmentation in Rat Skeletal Muscle Mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9679—9686.
1518. Vilsen B., Andersen J.P., Petersen J., Jorgensen P.L. (1987). Occlusion of $^{22}\text{Na}^+$ and $^{86}\text{Rb}^+$ in Membrane-bound and Soluble Protomeric $\alpha\beta$ -Units of Na,K-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **262**, 10 511—10 517.
1519. Vitala J., Jarnefelt J. (1985). The Red Cell Surface Revisited, *TIBS*, **10**, 392—395.
1520. Voelker D.R. (1985). Lipid Assembly into Cell Membranes, *Biochemistry of Lipids and Membranes* (D.E. Vance and J.E. Vance, Eds.), pp. 475—502, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California.
1521. Voelker D.R. (1984). Phosphatidylserine Functions as the Major Precursor of Phosphatidylethanolamine in Cultured BHK-21 Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2669—2673.
1522. Vogel H. (1981). Incorporation of Melittin in Phosphatidylcholine Bilayers, *FEBS Lett.*, **134**, 37—42.
1523. Vogel H., Jahnig F. (1986). Models for the Structure of Outer-membrane Proteins of *Escherichia coli* Derived from Raman Spectroscopy and Prediction Methods, *J. Mol. Biol.*, **190**, 191—199.
1524. Vogel H., Jahnig F. (1986). The Structure of Melittin in Membranes, *Biophys. J.*, **50**, 573—582.
1525. Vogel H., Wright J.K., Jahnig F. (1985). The Structure of the Lactose Permease Derived from Raman Spectroscopy and Prediction Methods, *The EMBO Journal*, **4**, 3625—3631.
1526. Vogel H., Gartner W. (1987). The Secondary Structure of Bacteriorhodopsin Determined by Raman and Circular Dichroism Spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **262**, 11 464—11 469.
1527. von Heijne G. (1986). Mitochondrial Targeting Sequences May Form Amphiphilic Helices, *The EMBO Journal*, **5**, 1335—1342.
1528. von Heijne G. (1986). Towards a Comparative Anatomy of N-Terminal Topogenic Protein Sequences, *J. Mol. Biol.*, **189**, 239—242.
1529. von Heijne G. (1986). The Distribution of Positively Charged Residues in Bacterial Inner Membrane Proteins Correlates with the Transmembrane Topology, *The EMBO Journal*, **5**, 3021—3027.
1530. von Heijne G. (1986). A New Method for Predicting Signal Sequence Cleavage Sites, *Nucleic Acids Research*, **14**, 4683—4690.
1531. von Heijne G., Segrest J.P. (1987). The Leader peptides from Bacteriorhodopsin and Halorhodopsin Are Potential Membrane-spanning Amphipathic Helices, *FEBS Lett.*, **213**, 238—240.
1532. von Jagow G., Link T.A., Ohnishi T. (1986). Organisation and Function of Cytochrome b and Ubiquinone in the Cristae Membrane of Beef Heart Mitochondria, *J. Bioenerg. and Biomemb.*, **18**, 157—179.
1533. Vos-Scheperkeuter G.H., Witholt B. (1984). Assembly Pathway of Newly Synthesized Lamb Protein, an Outer Membrane Protein of *Escherichia coli* K-12, *J. Mol. Biol.*, **175**, 511—528.
1534. Waggoner A.S. (1979). Dye Indicators of Membrane Potential, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **8**, 47—68.
1535. Waldemann T.A. (1986). The Structure, Function, and Expression of Interleukin-2 Receptors on Normal and Malignant Lymphocytes, *Science*, **232**, 727—732.
1536. Walker J.E., Carne A.F., Schmitt H.W. (1979). The Topography of the Purple Membrane, *Nature*, **278**, 653—654.
1537. Wallace B.A. (1986). Structure of Gramicidin A, *Biophysical Discussion Abstracts*, 277—286.
1538. Wallace B.A., Teeters C.L. (1987). Differential Absorption Flattening Optical Effects Are Significant in the Circular Dichroism Spectra of Large Membrane Fragments, *Biochemistry*, **26**, 65—70.
1539. Wallace B.A., Mao D. (1984). Circular Dichroism Analysis of Membrane Proteins: An Examination of Differential Light Scattering and Absorption Flattening Effects in Large Membrane Vesicles and Membrane Sheets, *Anal. Biochem.*, **142**, 317—328.
1540. Wallace B.A., Cascio M., Mielke D.L. (1986). Evaluation of Methods for the Prediction of Membrane Protein Secondary Structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9423—9427.
1541. Wallace B.A., Kohl N. (1984). The C-Terminus of Bacteriorhodopsin is a Random Coil., *Biochim. Biophys. Acta*, **777**, 93—98.
1542. Wallace B.A., Henderson R. (1982). Location of Carboxyl Terminus of Bacteriorhodopsin in Purple Membrane, *Biophys. J.*, **39**, 233—239.
1543. Wallach D.F.H., Zahler P.H. (1966). Protein Conformations in Cellular Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 1552—1559.
1544. Wallach D.F.H., Verma S.P., Fookson J. (1979). Application of Laser Raman and Infrared Spectroscopy to the Analysis of Membrane Structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 153—208.

1545. Walsh J.P., Bell R.M. (1986). sn-1,2-Diacylglycerol Kinase of *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., **261**, 6239—6247.
1546. Walter A., Gutknecht J. (1986). Permeability of Small Nonelectrolytes through Lipid Bilayer Membranes, J. Membrane Biol., **98**, 207—217.
1547. Walter P. (1987). Signal Recognition: Two Receptors Act Sequentially, Nature, **328**, 763—764.
1548. Walter P., Blobel G. (1982). Signal Recognition Particle Contains a 7S RNA Essential for Protein Translocation across the Endoplasmic Reticulum, Nature, **299**, 691—784.
1549. Wang J.-F., Falke J.J., Chan S.I. (1986). A Proton NMR Study of the Mechanism of the Erythrocyte Glucose Transporter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 3277—3281.
1550. Ward D.M., Kaplan J. (1986). Mitogenic Agents Induce Redistribution of Transferrin Receptors from Internal Pools to the Cell Surface, Biochem. J., **238**, 721—728.
1551. Warren G.B., Houslay M.D., Metcalfe J.C., Birdsall N.J.M. (1975). Cholesterol Is Excluded from the Phospholipid Annulus Surrounding an Active Calcium Transport Protein, Nature, **255**, 684—687.
1552. Warschel A. (1981). Electrostatic Basis of Structure-Function Correlation in Proteins, Acc. Chem. Res., **14**, 284—290.
1553. Warshel A., Russell S.T., Churg A.K. (1984). Macroscopic Models for Studies of Electrostatic Interactions in Proteins: Limitations and Applicability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 4785—4789.
1554. Wasmann C.C., Reiss B., Bartlett S.G., Bohnert H.J. (1986). The Importance of the Transit Peptide and the Transported Protein for Protein Import into Chloroplasts, Mol. Gen. Genet., **205**, 446—453.
1555. Waters M.G., Blobel G. (1986). Secretory Protein Translocation in a Yeast Cell-free System Can Occur Posttranslationally and Requires ATP Hydrolysis, J. Cell Biol., **102**, 1543—1550.
1556. Waters M.G., Chirico W.J., Blobel G. (1986). Protein Translocation across the Yeast Microsomal Membrane Is Stimulated by a Soluble Factor, J. Cell Biol., **103**, 2629—2636.
1557. Wattenberg B.W., Silbert D.F. (1983). Sterol Partitioning among Intracellular Membranes, J. Biol. Chem., **258**, 2284—2289.
1558. Wattenberg B.W., Rothman J.E. (1986). Multiple Cytosolic Components Promote Intra-Golgi Protein Transport: Resolution of a Protein Acting at a Late Stage, Prior to Membrane Fusion, J. Biol. Chem., **261**, 2208—2213.
1559. Watts T.H., Gaub H.E., McConnell H.M. (1986). T-Cell-Mediated Association of Peptide Antigen and Major Histocompatibility Complex Protein Detected by Energy Transfer in an Evanescent Wave-Field, Nature, **320**, 179—181.
1560. Waxman S.G., Ritchie J.M. (1986). Organization of Ion Channels in the Myelinated Nerve Fiber, Science, **228**, 1502—1507.
1561. Weber K., Johnsson N., Plessmann U., Nguyen Van P., Soling H.-D., Ampe C., Vandeckerckhove J. (1987). The Amino Acid Sequence of Protein II and its Phosphorylation Site for Protein Kinase C; the Domain Structure Ca^{2+} -modulated Lipid Binding Proteins, The EMBO Journal, **6**, 1599—1604.
1562. Weckstrom K. (1985). Aqueous Micellar Systems in Membrane Protein Crystallization, FEBS Lett., **192**, 220—224.
1563. Weinberg R.A. (1985). The Action of Oncogenes in the Cytoplasm and Nucleus, Science, **230**, 770—776.
1564. Weinstein S., Durkin J.T., Veatch W.R., Blout E.R. (1985). Conformation of the Gramicidin A Channel in Phospholipid Vesicles: A Fluorine-19 Nuclear Magnetic Resonance Study, Biochemistry, **24**, 4374—4382.
1565. Weis R.M., McConnell H.M. (1984). Two-dimensional Chiral Crystals of Phospholipid, Nature, **310**, 47—49.
1566. Weiss H., Wingfield P. (1979). Enzymology of Ubiquinone-Utilising Electron Transfer Complexes in Nonionic Detergent, Eur. J. Biochem., **99**, 151—160.
1567. Weissman A.M., Samelson L.E., Klausner R.D. (1986). A New Subunit of the Human T-Cell Antigen Receptor Complex, Nature, **324**, 480—482.
1568. Welsh E.J., Thom D., Morris E.R., Rees D.A. (1985). Molecular Organization of Glycophorin A: Implications for Membrane Interactions, Biopolymers, **24**, 2301—2332.
1569. Weyer K.A., Schafer W., Lottspeich F., Michel H. (1987). The Cytochrome Subunit of the Photosynthetic Reaction Center from Rhodospirillum rubrum Is a Lipoprotein, Biochemistry, **26**, 2909—2914.
1570. White D.A. (1973). The Phospholipid Composition of Mammalian Tissues. Form and Function of Phospholipids (G.B. Ansell, J.N. Hawthorne, and R.M.C. Dawson, Eds.), 2nd Edition, pp. 441—482, Elsevier Scientific Publication Company, New York.
1571. White J., Kielian M., Helenius A. (1983). Membrane Fusion Proteins of Enveloped Animal Viruses, Quarterly Reviews of Biophysics, **16**, 151—195.
1572. Whiting P., Lindstrom J. (1987). Affinity Labelling of Neuronal Acetylcholine Receptors Localizes Acetylcholine-binding Sites to Their β -Subunits, FEBS Lett., **213**, 55—60.
1573. Whitmarsh J. (1986). Mobile Electron Carriers in Thylacoids, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. **19**, Photosynthesis III, **19**, 508—527.
1574. Wickner W. (1976). Asymmetric Orientation of Phage M13 Coat Protein in *Escherichia coli* Cytoplasmic Membranes and in Synthetic Lipid Vesicles, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 1159—1163.
1575. Wickner W. (1979). The Assembly of Proteins into Biological Membranes: The Membrane Trigger Hypothesis, Ann. Rev. Biochem., **48**, 23—45.
1576. Wickner W.T., Lodish H.F. (1985). Multiple Mechanisms of Protein Insertion Into and Across Membranes, Science, **230**, 400—407.
1577. Wiech H., Sagstetter M., Muller G., Zimmermann R. (1987). The ATP Requiring Step in Assembly of M13 Procoat Protein into Microsomes Is Related to Preservation of Transport Competence of the Precursor Protein, The EMBO Journal, **6**, 1011—1016.
1578. Wiedmann M., Kurzchalia T.V., Hartmen E., Rappoport T.A. (1987). A Signal Sequence Receptor in the Endoplasmic Reticulum Membrane, Nature, **328**, 830—833.
1579. Wiedmann M., Kurzchalia T.V., Bielka H., Rappoport T.A. (1987). Direct Probing of the Interaction between the Signal Sequence of Nascent Preprolactin and the Signal Recognition Particle by Specific Cross-linking, J. Cell Biol., **104**, 201—208.
1580. Wieland F.T., Gleason M.L., Serafini T.A., Rothman J.E. (1987). The Rate of Bulk Flow from the Endoplasmic Reticulum to the Cell Surface, Cell, **50**, 289—300.
1581. Weiner J.R., Pal R., Barenholz Y., Wagner R.R. (1985). Effect of the Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein on the Lateral Organization of Lipid Bilayers Containing Phosphatidylglycerol: Use of Fluorescent Phospholipid Analogues, Biochemistry, **24**, 7651—7658.
1582. Wieslander A., Rilfors L., Lindblom G. (1986). Metabolic Changes of Membrane Lipid Composition in *Acholeplasma laidlawii* by Hydrocarbons, Alcohols, and Detergents: Arguments for Effects on Lipid Packing, Biochemistry, **25**, 7511—7517.
1583. Wilcox C.A., Olson E.N. (1987). The Majority of Cellular Fatty Acid Acylated Proteins Are Localized to the Cytoplasmic Surface of the Plasma Membrane, Biochemistry, **26**, 1029—1036.
1584. Wileman T., Harding C., Stahl P. (1985). Receptor-mediated Endocytosis, Biochem. J., **232**, 1—14.
1585. Wiley D.C., Skehel J.J. (1987). The Structure and Function of the Hemagglutinin Membrane Glucoprotein of Influenza Virus, Ann. Rev. Biochem., **56**, 365—394.
1586. Wilkens M.H.F., Blaurock A.E., Engelman D.M. (1971). Bilayer Structure in Membranes, Nature New Biology, **230**, 72—76.

1587. *Wilkinson D.A., Nagle J.F.* (1979). Dilatometric Study of Binary Mixtures of Phosphatidylcholines, *Biochemistry*, **18**, 4244—4249.
1588. *Wilkinson W.O., Walsh J.P., Corless J.M., Bell R.M.* (1986). Crystalline Arrays of the *Escherichia coli* sn-Glycerol-3-phosphate Acyltransferase, an Integral Membrane Protein, *J. Biol. Chem.*, **1986**, 9951—9958.
1589. *Williams M.A., Lamb R.A.* (1986). Determination of the Orientation of an Integral Membrane Protein and Sites of Glycosylation by Oligonucleotide-Directed Mutagenesis: Influenza B Virus NB Glycoprotein Lacks a Cleavable Signal Sequence and Has an Extracellular NH₂-Terminal Region, *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4317—4328.
1590. *Williams R.W.* (1983). Estimation of Protein Secondary Structure from the Laser Raman Amide I Spectrum, *J. Mol. Biol.*, **166**, 581—603.
1591. *Williamson P., Antia R., Schlegel R.A.* (1987). Maintenance of Membrane Phospholipid Asymmetry, *FEBS Lett.*, **219**, 316—320.
1592. *Wills N.K., Zweifach A.* (1987). Recent Advances in the Characterization of Epithelial Ionic Channels, *Biochim. Biophys. Acta*, **906**, 1—31.
1593. *Wilschut J., Hoekstra D.* (1984). Membrane Fusion: From Liposomes to Biological Membranes, *TIBS*, **9**, 479—483.
1594. *Wilschut J., Hoekstra D.* (1986). Membrane Fusion: Lipid Vesicles as a Model System, *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 145—166.
1595. *Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C.* (1981). Structure of the Haemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenza Virus at 3 Å Resolution, *Nature*, **289**, 366—373.
1596. *Winiski A.P., McLaughlin A.C., McDaniel R.V., Eisenberg M., McLaughlin S.* (1986). An Experimental Test of the Discreteness-of-Charge Effect in Positive and Negative Lipid Bilayers, *Biochemistry*, **25**, 8206—8214.
1597. *Witzke N.M., Bittman R.* (1984). Dissociation Kinetics and Equilibrium Binding Properties of Polyene Antibiotic Complexes with Phosphatidylcholine/Sterol Vesicles, *Biochemistry*, **23**, 1668—1674.
1598. *Wolf D.E.* (1985). Determination of the Sidedness of Carbocyanine Dye Labeling of Membranes, *Biochemistry*, **24**, 582—586.
1599. *Wolf D.E., Scott B.K., Millette C.F.* (1986). The Development of Regionalized Lipid Diffusibility in the Germ Cell Plasma Membrane during Spermatogenesis in the Mouse, *J. Cell Biol.*, **103**, 1745—1750.
1600. *Wolfe P.B., Rice M., Wickner W.* (1985). Effects of Two sec Genes on Protein Assembly into the Plasma Membrane of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **260**, 1836—1841.
1601. *Wolfe P.B., Wickner W.* (1984). Bacterial Leader Peptidase, a Membrane Protein without a Leader Peptide, Uses the Same Export Pathway as Pre-secretory Proteins, *Cell*, **36**, 1067—1072.
1602. *Wolfenden R., Andersson L., Cullis P.M., Southgate C.C.B.* (1981). Affinities of Amino Acid Side Chains for Solvent Water, *Biochemistry*, **20**, 849—855.
1603. *Wolfman A., Macara I.G.* (1987). Elevated Levels of Diacylglycerol and Decreased Phorbol Ester Sensitivity in Ras-Transformed Fibroblasts, *Nature*, **325**, 359—361.
1604. *Woodgett C., Rose J.K.* (1986). Amino-Terminal Mutation of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Does Not Affect Its Fusion Activity, *J. Virology*, **59**, 486—489.
1605. *Woods Jr., V.L., Wolff L.E., Keller D.M.* (1986). Resting Platelets Contain a Substantial Centrally Located Pool of Glycoprotein IIb—IIIa Complex Which May Be Accessible to Some but Not Other Extracellular Proteins, *J. Biol. Chem.*, **261**, 15 242—15 251.
1606. *Worcester D.L., Franks N.P.* (1976). Structural Analysis of Hydrated Egg Lecithin and Cholesterol Bilayers. II. Neutron Diffraction, *J. Mol. Biol.*, **100**, 359—378.
1607. *Wright J.K.* (1986). The Kinetic Mechanism of Galactoside/H⁺ Cotransport in *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **855**, 391—416.
1608. *Wright J.K., Seckler R., Overath P.* (1986). Molecular Aspects of Sugar: Ion Cotransport, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 225—248.
1609. *Wright P.S., Morand J.N., Kent C.* (1985). Regulation of Phosphatidylcholine Biosynthesis in Chinese Hamster Ovary Cells by Reversible Membrane Association of CTP: Phosphocholine Cytidyltransferase, *J. Biol. Chem.*, **260**, 7919—7926.
1610. *Wu J.-S.R., Lever J.E.* (1987). Purification and Reconstitution of a 75-Kilodalton Protein Identified as a Component of the Renal Na⁺/Glucose Symporter, *Biochemistry*, **26**, 5958—5962.
1611. *Wynn C.H.* (1986). A Triple-binding-domain Model Explains the Specificity of the Interaction of a Sphingolipid Activator Protein (SAP-1) with Sulphatide, GM₁-ganglioside and Glubotriaosylceramide, *Biochem. J.*, **240**, 921—924.
1612. *Yamane K., Ichihara S., Mizushima S.* (1987). In Vitro Translocation of Protein across *Escherichia coli* Membrane Vesicles Requires Both the Proton Motive Force and ATP, *J. Biol. Chem.*, **262**, 2358—2362.
1613. *Yarden Y., Harari I., Schlessinger J.* (1985). Purification of an Active EGF Receptor Kinase with Monoclonal Antibodies, *J. Biol. Chem.*, **260**, 315—319.
1614. *Yarden Y., Schlessinger J.* (1987). Epidermal Growth Factor Induces Rapid, Reversible Aggregation of the Purified Epidermal Growth Factor Receptor, *Biochemistry*, **26**, 1443—1451.
1615. *Yarden Y., Escobedo J.A., Kuang W.-J., Yang-Feng T.L., Daniel T.O., Tremble P.M., Chen E.Y., Ando M.E., Harkins R.N., Francke U., Fried V.A., Ullrich A., Williams L.T.* (1986). Structure of the Receptor for Platelet-derived Growth Factor Helps Define a Family of Closely Related Growth Factor Receptors, *Nature*, **323**, 226—232.
1616. *Yagle P.* (1986). Hydration and the Lamellar to Hexagonal II Phase Transition of Phosphatidylethanolamine, *Biochemistry*, **25**, 7518—7522.
1617. *Yeagle P.L.* (1985). Cholesterol and the Cell Membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **822**, 267—287.
1618. *Yeagle P.L., Young J.E.* (1986). Factors Contributing to the Distribution of Cholesterol among Phospholipid Vesicles, *J. Biol. Chem.*, **261**, 8175—8181.
1619. *Yeates T.O., Komiya H., Rees D.C., Allen J.P., Feher G.* (1987). Structure of the Reaction Center from *Rhodospirillum rubrum* R-26: Membrane-Protein Interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6438—6442.
1620. *Yoshida H., Tondokoro N., Asano Y., Mizusawa K., Yamagishi R., Horigome T., Sugano H.* (1987). Studies on Membrane Proteins Involved in Ribosome Binding on the Rough Endoplasmic Reticulum, *Biochem. J.*, **245**, 811—819.
1621. *Yoshikawa W., Akutsu H., Kyogoku Y.* (1983). Light-scattering Properties of Osmotically Active Liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **735**, 397—406.
1622. *Yoshima H., Furthmayr H., Kobata A.* (1980). Structure of the Asparagine-linked Sugar Chains of Glycophorin A, *J. Biol. Chem.*, **255**, 9713—9718.
1623. *Young E.F., Ralston E., Blake J., Ramachandran J., Hall Z.W., Stroud R.M.* (1985). Topological Mapping of Acetylcholine Receptors: Evidence for a Model with Five Transmembrane Segments and a Cytoplasmic COOH-terminal Peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 626—630.
1624. *Young J.D.-E., Cohn Z.A., Podack E.R.* (1986). The Ninth Component of Complement and the Pore-Forming Protein (Perforin I) from Cytotoxic T Cells: Structural, Immunological, and Functional Similarities, *Science*, **233**, 184—190.
1625. *Yu J., Elgsaeter A., Branton D.* (1977). Intramembrane Particle Aggregation in Erythrocyte Membranes and Band 3-Lipid Recombinants, *Cell Shape and Surface Architecture* (J.P. Revel, U. Henning, and C.F. Fox, Eds.), 453—458, Alan R. Liss, Inc., New York.
1626. *Yu J., Branton D.* (1976). Reconstitution of Intramembrane Particles in Recombinants

- of Erythrocyte Protein Band 3 and Lipid: Effects of Spectrin-Actin Association, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3891—3895.
1627. Zachowski A., Herrmann A., Paraf A., Devaux P.F. (1987). Phospholipid Outside-Inside Translocation in Lymphocyte Plasma Membranes Is a Protein-Mediated Phenomenon, Biochim. Biophys. Acta, 897, 197—200.
1628. Zachowski A., Favre E., Cribier S., Herve P., Devaux P.F. (1986). Outside-Inside Translocation of Aminophospholipids in the Human Erythrocyte Membrane Is Mediated by a Specific Enzyme, Biochemistry, 25, 2585—2590.
1629. Zhang Y.-Z., Capaldi R.A., Cullis P.R., Madden T.D. (1985). Orientation of Cytochrome c Oxidase Molecules in the Two Populations of Reconstituted Vesicles Resolved by Column Chromatography on DEAE-Sephacryl, Biochim. Biophys. Acta, 808, 209—211.
1630. Zibirre R., Hippler-Feldtmann G., Kuhne J., Poronnik P., Warnecke G., Koch G. (1987). Detection and Localization of a Cytoplasmic Domain on the β -Subunit of Na^+ , K^+ -ATPase, J. Biol. Chem., 262, 4349—4354.
1631. Zimmer D.B., Green C.R., Evans W.H., Gilula N.B. (1987). Topological Analysis of the Major Protein in Isolated Intact Rat Liver Gap Junctions and Gap Junction-derived Single Membrane Structures, J. Biol. Chem., 262, 7751—7763.
1632. Zimmerberg J., Curran M., Cohen F.S., Brodwick M. (1987). Simultaneous Electrical and Optical Measurements Show That Membrane Fusion Precedes Secretory Granule Swelling During Exocytosis of Beige Mouse Mast Cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1585—1589.
1633. Zingsheim H.P., Neugebauer D.-C., Frank J., Hanicke W., Barrantes F.S. (1982). Dimeric Arrangement and Structure of the Membrane-bound Acetylcholine Receptor Studied by Electron Microscopy, The EMBO Journal, 1, 541—547.

Агенты, облегчающие слияние мембран 426

Адгезивная молекула нервных клеток (N-CAM) 165

Адгезин 402

Адгезия клеточная 401-412

Аденолатиклаза 32, 250, 438, 440, 443

Аденовирусы 481

Адренодоксин 268, 270

Адренодоксинредуктаза 268, 270

Адриамицин 296, 435

1-азидо-4-[^{125}I]-нодбензол (АИБ) 176

Активные переносчики 333-334

Актин 22, 182, 186

α -Актинин 281

Аламетинин 159-162, 305, 328, 356

Алкил-N-метилглюкамиды 115

Алкилтриарилфосфонийнитроксид 319

Алкогольдегидрогеназа III 489

Альдолаза 282

9-аминоакридин 326

Аминокислоты, классификация: шкала «гидропатии» Кайта—Дулиттла 153-154, 156

— — — Голдмана—Энгелмана—Стейца 153-154, 156

Аминопептидаза 32

Амфифильные молекулы 76-78, 294-296

Амфотерицин В 296, 353

Анестетики 294

— местного действия 295

— стероидные 295

Анизотропия флуоресцентных зондов 211

— флуоресценции 217, 218

— фосфоресценции 220

1-анилинонафталин-8-сульфонат 319

Анкирин 165, 184, 186

Антибиотики 295

Антиген гистосовместимости класса I (HLA-A2) 476, 493

Антигены, связанные с функцией лимфоцитов (LFA) 397, 408

— дрозиды, позиционно специфические 411

Антипортер Na^+/H^+ 450

Антипортеры 334, 371-379

(*m,l*)-Антроилстеариновая кислота 208

Аполипопротеины 163-164

Апоцитохром с 473

Аппарат (комплекс) Гольджи 11, 14, 25, 32, 39, 461-465

Арахидоновая кислота 38, 287, 444-446

Арахидоновая кислота 38

Арилсульфатаза 249

Арсенаты 389

Асимметрия липидов 170

— мембран 170-181

Аффинная адсорбция 29

N-ацетилгалактозамин 167

N-ацетилглюкозамин 167

N-ацетилглюкозаминтрансфераза I 462, 463

Ацетилхолин 362, 367

Ацетилхолиновый рецептор 34, 120, 150, 225, 227, 333, 335, 337, 358, 362-367, 397, 436, 460

— — генетические исследования 366-367

— — измерение тока через канал 349-351

— — мускариновый 363, 397, 436, 440-441, 448, 451

— — реконструкция изображения 132

— — топография 179

— — четвертичная структура 126

Ацетилхолинэстераза 165, 244

- 1-ацил-*sn*-глицерол-3-фосфатидилтрансфераза 501
- Ацильные цепи в бислое 64-66
- взаимодействие с белками 234-239
- Ca^{2+} -АТРаза 34, 120, 123, 244, 263-264, 335, 382-386
- в везикулах 248
 - перенос ионов 323
 - связывание с липидами 232
- АТРаза вакуолярного типа 382, 390
- E_1E_2 -типа 382-386
 - F_1F_0 -типа 109-110, 125-126, 268, 274-275, 382, 386-388, 412
- АТР-синтаза 268, 273, 275, 386
- Базофилы 451
- Бактериальная мембрана, липидная асимметрия 194-195
- миграция липидов 196
 - содержание липополисахарида 195
- Бактерин барофильные морские 510
- рецепторные системы 431-436
 - связывание с гликолипидами 402
 - сигналы переноса и сортировки 484
 - содержание АТРаза 386-388
- Бактериородопсин 34, 111, 123, 130, 132, 145, 239, 333-334, 337
- генетические исследования 392
 - как H^+ -насос 391
 - карта электронной плотности 140-142
 - молекулярная масса 139
 - расположение спиралей 145
 - реконструкция 252, 255
 - изображения 130-133, 139-142
 - структура 139-145, 150-152, 156
 - топография 179-180
- Бактериофаги, белки оболочки 239-240
- Бактериофеофитин 134, 135, 138
- Бактериохлорофилл 134-135, 139
- Бактопреиол 96
- Бактопреиолкиназа 247
- Бегеновая кислота 38
- G-белки 228, 397, 438-443, 453
- Белки, агрегация 197, 221-222, 395
- ближние взаимодействия субъединиц 125-126
 - в протеолипосомах 254
 - взаимодействие с липидами 226-242
 - внеклеточного матрикса 409-412
 - внутриные (интегральные) 47, 117-128
 - наружные 47
 - вращение 206-207, 219-222
 - вторичная структура 122-124, 149, 152-159
 - выделение 45
 - гель-фильтрация 118-119
 - генетические подходы к изучению 178
 - гибридизация 178
 - гидрофобность остатков 158-159
 - гликозилирование 461
 - двумерные кристаллы 130-133
 - динамические свойства боковых цепей 239
 - — — остова мембранных белков 239
 - ДСН—ПААГ-электрофорез 117-118
 - избирательность связывания с липидами 232
 - изучение трехмерной структуры 128-131
 - иммунологические исследования 173-174
 - интегральные мембранные 234-239
 - инфракрасная спектроскопия 123
 - исследование методом радиационной инактивации 121
 - — спектральными методами 122-124
 - ковалентно связанные с углеводом 166-167
 - кристаллизация 128-131
 - кристаллы типа I 128-130
 - — — II 128-130
 - круговой дихроизм 122
 - латеральные перемещения 205
 - молекулярная масса субъединиц 117-118
 - наружные (периферические) 47-48
 - необходимые для переноса 495
 - облегчающие слияние мембран 427
 - оболочки бактериофагов 239-240
 - образующие поры 474
 - перенос через мембраны 456
 - периодичность в распределении гидрофобных остатков 158
 - посттрансляционные модификации 461
 - поступательное движение молекул 206-207
 - протонпереносащие 328
 - регуляторные 434
 - реконструкция изображения 128-133
 - рентгеновская дифракция 128-131
 - связывание с липидным бислоем 240-242
 - содержание в мембранах животных и бактериальных клеток 34, 44-47
 - — заряженных аминокислотных остатков 151-152
 - — пролина 152
 - — α -спиральных участков 122-124
 - сортировка 455-464, 475-494
 - спектроскопия комбинационного рассеяния 123
 - топография 170-181
 - трансмембранная асимметрия 170-181
 - трансмембранные 110, 148-159
 - транспортные 332-333
 - участвующие в межмембранном переносе фосфолипидов 508-509
 - ферментативная активность 124
 - «флип-флоп»-переходы 170
 - химическая модификация 174-178
 - цитолитические 392
 - частота движений в мембране 205
 - четвертичная структура 125-127
 - электронтранспортных цепей 244
 - ЯМР-спектроскопия 124
- Белково-детергентный комплекс 119-122
- Белок вывернутый 143-146, 150
- Оболочки бактериофага M13 118, 255, 472, 473, 484, 485
- полосы 3 22, 34, 120, 166, 183, 185-187, 221-222, 282, 305, 333, 334, 337-338, 345, 377, 399, 400, 460, 479
 - — — латеральная диффузия 225, 227
 - — — 4.1 184
 - — — 4.5 184
 - — — 4.9 185
 - — — 6 185
 - — — 7 185
 - стыковочный (рецептор CP4) 496
 - LamB 130, 147, 194, 361, 485, 498
 - OmpA 130, 147, 178, 194, 471, 485
 - OmpC 146-147, 361
 - OmpF 129-130, 132, 146-147, 361-362, 498
 - PhoE 146, 361
- Белок-пассажир 475
- Бислой, ацильные цепи 64, 72
- изменение упорядоченности 68-72
 - исследование с помощью ЯМР 62-63
- Бислойные мембраны на твердой подложке 103
- Бромелани 429
- Ваксеновая кислота 38, 510
- Вакуоли 382, 390
- Валиномицин 321, 324, 329
- Ванадат 383, 384
- Вандерваальсовы силы 73
- Везикулы 247-249, 318, 424-426, 462
- Кабака 25
 - окаймленные 382, 413-414, 418, 420-421, 462-463
 - рециклирующиеся 413
 - секреторные 413
- Виментин 183
- Вирус везикулярного стоматита 429, 460, 462, 481, 492
- гриппа 419, 428, 429-431, 460, 498
 - леса Семлики 419
 - Сендай 428
 - SV 40 482
- Вирусы, гликопротеины шипов 200-201, 428, 462
- почкование 200-201
 - с оболочкой 24, 200-201, 419, 428, 462, 481
- Вода, структура 73-74, 303-305, 327
- Водно-липидные смеси 54-73
- Водородные связи 73
- Ворсинки 402
- Воспалительный процесс 287
- Вращательная диффузия 215
- Вращение липидных молекул 205-207, 219-222
- Время вращательной корреляции 207, 211, 215, 218
- — релаксация 220
 - перехода 216
 - электрического ответа мембраны 338
- Выделение мембран 23-33
- Вязкость 210-211
- мембран 258, 265
- β -Галактозидаза 32
- Галактозилтрансфераза 32, 462, 464
- Галактозооксидаза 190
- Галактоцереброзид 42
- Галеродопсин 391
- Ганглиозид GM₁ 42, 505, 507, 509

- Гаиглиозиды 36, 42, 45
 — латеральная диффузия 226
 — образование монослоев 99
 Гексагональная фаза I 55, 59
 — — II 56, 61-63
 Гексан 294
 Гексокиназа 282
 Гель-фильтрация 118-119
 Гем 391
 Гемоллизин 427, 484
 Гентамицин 318
 Гепатоциты 11, 12
 Гербицидсвязывающий белок 500
 Гидратация липидов 57-58
 β -Гидроксibuтиратдегидрогеназа 249, 252, 256, 259-261
 Гидроксиметилглутарил-CoA-редуктаза 499
 Гидрофильно-липофильный баланс 112
 Гидрофобность углеводородов 74-78
 Гидрофобные ионы 297, 309, 319-321
 — метки TEMPO 207, 209, 215, 219
 — силы 73-74
 Гидрофобный момент 157-159
 Гиперхолестеролемия 421
 Гистамин 451
 Гликоглицеролипиды 41
 Гликозилдиацилглицерол 36
 Гликолипиды 190
 — участие в бактериальной адгезии 402
 — фазовые переходы 90-91
 Гликопротеин Ib 411
 — ассоциированный с миелином 397, 404
 — G вируса везикулярного стоматита 165
 — Thy-1 165
 НА-гликопротеин вируса гриппа 165
 Гликопротеиновый комплекс тромбоцитов 397
 Гликопротеины IIb/IIIa тромбоцитов 411
 — участвующие в адгезии нейронов 403
 Глисосомы 482
 Гликофинголипиды 42-43
 Гликофорины 34, 46, 110-111, 167, 195, 237
 — латеральная диффузия 225
 — реконструкция 254
 — A 118, 167, 183, 185, 399, 400
 — B 183, 185
 — C 183, 185
 Глиоксисомы 482
 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 34, 282
 Глицерол 164, 303
 Глицеролипиды 36
 Глицерол-3-фосфатацилтрансфераза 253, 255, 501
 Глицерофосфолипиды 35-37
 Глициновый рецептор 335, 362, 397, 436
 Глобозид 42, 399, 400
 Глюкагон 164
 Глюкозо-6-фосфатаза 32
 Глюкоцереброзид 42
 Гомогенизатор Даунса 24
 — Поттера—Элвекейма 24
 Гопаноиды 44
 Грамицидин 159-161, 196, 237, 328, 337, 343, 354-356
 Гранулы запасующие 382
 — секреторные 382, 413
 Граны 199
 График Фергюсона 117-118
 Двойной диффузионный слой 311
 Дегидратация фосфолипидов 425
 Дезоксихолат натрия 114, 116
 Декстран 427
 Декстран—фиколл 29
 Десатурация жирных кислот 269
 Десмосомы 13
 Детергенты 11-116, 250-253, 296, 394
 — анионные 114
 — использование для реконструкции ферментов 250-253
 — катионные 114
 — незаряженные 114
 — свойства 116
 — удаление диализом 106
 — цвиттерионные 115
 Дзета-потенциал 318
 Диазотированная сульфаниловая кислота 176
 Диализ, удаление детергента 106
 Диарахидонилфосфатидилхолин 89
 Диацилглицерол 446, 503, 507, 510
 — активация протеинкиназы C 277-279
 — трансмембранная миграция 195
 CDP-диацилглицерол 501-503
 Диацилглицеролкиназа 281, 507
 Диацилглицероллипаза 445, 446
 CDP-диацилглицеролсинтаза 501-503
 Диацилфосфолипиды 65-66
 Дибегенолфосфатидилхолин 98
 Дибуканн 295
 Дигалактозилдиацилглицерол 56
 Дигалактозилдиглицерол 41, 83
 Дигидрофолатредуктаза 493
 Дигитонин 114, 296, 394
 Диглюкозилдиглицериды (ДГДГ) 511
 Дилаурилфосфатидилхолин 93
 Диметил-3,3'-дитиобиспропионимидат 127
 N,N-диметил-N-нонил-N-темпонламмонийбромид 319
 Димиристолфосфатидилглицерол 50, 241
 Димиристолфосфатидилхолин 49-54, 507
 — исследование методом ^2H -ЯМР 68-70
 Димиристолфосфатидилэтанолламин 49-50, 87
 Димиристолфосфатидиная кислота 49-54, 87
 Диолеилфосфатидилхолин 237
 1,2-диолеилглицерол-3-(4-[^2H]формилфенилфосфат) 177
 Дипальмитоилфосфатидилсерин 71
 Дипальмитоилфосфатидилхолин 59, 60, 65-66, 89, 92, 507
 — взаимодействие с холестерином 95
 — исследование методом дифракции нейтронов 72
 — — — ^2H -ЯМР 71
 — образование бислоевых мембран 103
 — — монослоев 98-101
 Дипальмитоилфосфатидилэтанолламин 92
 Дипольный потенциал 307-311, 321
 Дистеаронилфосфатидилхолин 89, 93
 Дисукцинимидилсуберат 127
 Дисукцинимидилтартрат 127
 Дитиобис(сукцинимидилпропионат) 127
 4,4-дитиобисфенилазид 128
 Дифенилгексатриен (ДФГ) 207-208, 219, 235
 Дифосфатидилглицеролы 38
 Дифракция нейтронов 72
 — рентгеновских лучей 18-19
 Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) 85-91, 236
 Дифференцировка клетки 401, 410
 Диффузионный потенциал 322
 Диффузия вращательная 215
 — изотропная 207
 — облегченная 334
 Дихроизм поглощения 220
 Дизлаидонилфосфатидилхолин 93
 Диэлектрическая проницаемость 308
 ДНК, репликация 9
 β -D-додецилмальтозид 114, 116
 Додецил-N-саркозинат натрия 114
 Додецилсульфат натрия (ДСН) 75, 114, 116
 Долихол 44, 96
 Домены макроскопические 197, 204
 ДСН—ПААГ-электрофорез 117-118
 Дыхательная цепь, места сопряжения 273
 — — митохондрий 267-268, 271-275
 Емкость (C) 336, 339
 Животные клетки, передача сигналов 435-452
 — — поверхность 399
 Жирнокислотный состав мембран 38
 Жирные кислоты 37-41, 510
 — — свободные 44
 — — синтез 501
 — — спин-меченные 309
 — — участие в образовании бислоев 107
 Закон Ома 306
 Замораживание—оттаивание, использование при реконструкции ферментов 252
 Зоиды стирольной природы 325
 — флуоресцентные 208-219, 296
 Изетиоилацетимидат (ИАИ) 176
 Изотерма адсорбции Ленгмюра 291-293
 Иммуная реакция, МНС-ограниченная 407
 Иммуный ответ 402, 406-409
 Иммуноглобулиновое суперсемейство 397, 404-405, 408-409, 423, 452
 Инвертаза 476

Ингибиторы протеаз 112
 Инозитол(1,4,5)трифосфат 444-445
 Инсулиновый рецептор 120, 397, 414, 416-419, 437
 Интегрины 397, 409
 Инфракрасная спектроскопия 68
 — с фурье-преобразованием 235
 Ионные каналы 334, 438
 — ингибиторы 351
 — потенциалзависимые 335, 342-343, 494
 — регистрация тока, протекающего через одиночный канал 348-352
 — регулируемые 336
 — селективность 343
 — насосы 334, 337, 382-386
 Ионофоры 328-330
 Ионы, активный транспорт 323-325
 — взаимодействие с мембранами 297, 308, 323-324, 326-330
 — гидрофобные 297
 — металлов, связывание с мембранами 316-317
 Испарение обращенной фазы 253
 Кадхерины 406
 Калиевые каналы 198, 335-337, 351-352, 369-370
 Кальмодулин 421
 Кальциевый канал 335, 370, 439, 444, 445
 — блокируемый диэтилопиридином 370
 Кальций, облегчение слияния мембран 426-427
 Кальция ионы, связывание с мембранами 316-318
 Каналы для воды 305
 — как ферменты, теория скоростей 340-346
 — потенциалзависимые анионселективные 362
 — регулируемые нейромедиаторами 335
 — химически 333
 Карбоксинатрактилозид 379
 Карбонилцианид-п-трифторметоксибензилгидразон (FCCP) 329
 Карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон (CCCP) 329
 Карбоцианиновые красители 296

Кардиолипин 33-34, 37-38, 83, 90, 190, 232, 236, 242, 317, 501-503, 508
 Кардиолипинсинтаза 501
 Кардиотоксин 237
 Каротиноиды 96
 Каталаза 32
 Катионы, взаимодействие с мембранами 297
 Кератины 182
 3-кетотиацил-АССР-синтаза II 510
 α -Кетоглутарат/малат-транслоказа 379
 Кислая фосфатаза 32, 462
 Клатрин 197, 413, 414, 420
 А-клетки 406-407
 В-клетки 406-408
 Т-клетки 393, 406-408
 Клетки губки, агрегация 412
 — обработка ультразвуком 25
 — поляризованные эпителиальные 12, 170, 197-198, 417, 481
 — стволовые кроветворные 402
 Клеточная адгезия 401-412
 Т-клеточные антигены очень поздние 397
 Т-клеточный рецептор 397, 404-408, 499
 Коклюшиный токсин 441, 442
 Количины 393, 474
 Колхицин 183
 Комплекс гистосовместимости у мышей 255, 397, 404-408
 Комплексы мультисубъединичные 498
 Компонент комплемента C9 474
 Кониексии 132, 197, 359
 Кошцевые пластинки 362-367
 Кооперативная единица 86
 Коронавирусы 481
 Кортикотропин 163
 Коэффициент вращательной диффузии 207
 — диффузии 297-302
 — поступательной диффузии 224
 — проницаемости 299-301
 — распределения 211, 298-301
 — седиментации 26
 Креатинфосфокиназа 281
 Кристаллы белков 128-133
 — липидов 49-54
 Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) 76-78
 Критический параметр упаковки 78-82

Круговой дихроизм 122
 Кубическая фаза 59
 Кэпинг 197, 416
 Кювета *Лэнгмюра* 15, 97
 α -Лактальбумин 427
 Лактатдегидрогеназа 32
 Лактозопермеаза 110-112, 117, 151, 244, 250, 333, 337, 347, 348, 373, 375
 Лактопероксидаза 175
 Ламеллярная жидкокристаллическая фаза 55-56, 60-63
 Ламинин 410
 Латеральная гетерогенность мембран 196
 — диффузия 222-228
 — гидродинамическая модель 224-225
 Лауридиметиламидоксид 115
 Лауриновая кислота 38
 Лейкоцитарные белки адгезии 397, 411
 Лекарственная устойчивость множественная 389
 Лекарственные препараты 295
 Лектин 402
 Лиганды 289-297
 — центры связывания 290-293
 Лизосомотропные агенты 419
 Лизосомы 11, 14, 32, 33, 382, 412, 415-418, 464
 Лизофосфолипиды 33
 Лизофосфолипиды 36, 44, 83, 506
 Лимфоциты 402
 Линолевая кислота 38
 Лиотропный переход 57
 Липидная асимметрия в фосфолипидных везикулах 191
 Липидные микродомены 197, 201-202
 — молекулы, форма 83-84
 — системы, фазовые переходы 84-96
 — структуры, термодинамика полиморфизма 72-84
 — метки в фосфолипидных везикулах 225
 — частоты 62, 236
 Липидный бислой 67-72
 — адсорбция лигандов 289-297
 — взаимодействие с ним неполярных веществ 293
 — изменения в присутствии интегральных белков 234-239

— инфракрасная спектроскопия 68
 — локальная кривизна 237-239
 — проницаемость для ионизирующих излучений 297-305
 — связывание периферических мембранных белков 240-242
 — уменьшение толщины 238
 — упаковка ацильных цепей 64-66
 — упругие деформации 237-239
 Липиды 33-43
 — асимметрия 170
 — трансмембранная 187-190
 — в мембране эритроцитов 191-193
 — взаимодействие с белками 226-242
 — вращение 206-207
 — гидратация 57-59
 — жирнокислотный состав 38
 — ковалентно связанные с белком 164-166
 — кристаллы 49-54
 — латеральные перемещения 205
 — набухание в воде 58
 — наружной мембраны бактериальных клеток 195
 — не образующие стабильных бислоев 57
 — ориентация полярных головок в бислое 63
 — поступательное движение молекул 206-207
 — распределение в мембранах 500-510
 — связывание с внутримембранными белками 229-233
 — скорость обмена 205
 — температура плавления 88
 — трансмембранная асимметрия 187-196, 205
 — миграция 192, 195-196
 — транспорт от места их синтеза 504-506
 — «флип-флоп»-переходы 187, 192, 193, 205, 504
 — частота движений в мембране 205
 Липокортины 288
 Липопротейн *Брауна* 164, 195
 — основной 194
 Липопротейны 163-164, 195
 Липосомы 103-107, 302
 — проницаемость 302
 Липофиллин 34
 Локальная кривизна бислоя 237-239

- Магния ионы, связывание с мембранами 317
 Макрофаги 406-407
 Мальтаза-глюкоамилаза 245
 Мальтозосвязывающий белок 432, 471, 485, 487
 Маннитол 25
 Маннозидаза 462, 463
 Маннито-6-фосфат 403, 418
 Марганца ионы, связывание с мембранами 317-318
 Маркерные ферменты 31-32
 Мастоциты 451
 Матриксный белок вируса везикулярного стоматита 200-201, 240
 Межмолекулярное отталкивание 80
 Мелиттин 144, 158, 161-164, 427
 Мембрана апикальная 11, 12, 198
 — базолатеральная 12, 198
 — бактериальная, липидный состав 34
 — внутренняя 484
 — наружная 484
 — плазматическая 10-13, 33-35, 39, 197, 382, 399-401
 — термофильных бактерий 40
 — эритроцитов 15, 43, 399, 400
 — исследование с помощью электронной микроскопии 20-22
 — — липидная асимметрия 191-193
 — — миграция липидов 195
 — — проницаемость 303-305
 — — транспорт глюкозы 372
 — — «флип-флоп»-переходы 192
 — ядерной оболочки 13, 33, 461
 Мембранная триггерная гипотеза 473
 Мембранные белки, биосинтез 466
 — встраивание в мембрану 455-460, 475-494
 — — как амфифильные соединения 148-151, 157-159, 163-164
 — — латеральная диффузия 222-228
 — — обновление 498-500
 — — очистка 111-116
 — — содержание остатков аргинина 152
 — — структура 109-111
 — — химическое сшивание 125-126
 — — частично развернутая конфигурация 469
 — — энергетические требования к переносу 468
 — зонды 209-219, 296, 319-321
 — липиды, латеральная диффузия 222-228
 Мембранный транспорт веществ 398, 412
 Мембраны, адаптация к повышению давления 510
 — архобактерий 38, 42
 — асимметричное распределение заряда 320-321
 — ацидофильных бактерий 40
 — бактериальных клеток 34
 — боковых поверхностей соприкасающихся животных клеток 25
 — выделение 23, 45
 — галофильных бактерий 40
 — грамотрицательных бактерий 24
 — грамположительных бактерий 24
 — дисков 34
 — домейная структура 170
 — клеток печени крысы 33, 39
 — латеральная гетерогенность 196-200
 — липидный состав 510
 — очистка 23-33
 — палочек сетчатки 198
 — поверхностный потенциал 249, 307, 311-321
 — поддержание в текучем состоянии 510
 — реконструкция ферментов 250-253, 348-352
 — с фиксированной плотностью зарядов 311-317
 — слияние 58
 — содержание и функции липидов 44-45
 — текучесть 210-219
 — тилакоидные 15, 41, 57, 170, 199-200, 249, 267-268, 275-276
 — холинэргического рецептора 34
 — хромаффинных гранул 44
 — электрические свойства 305-321
 — эритроцитов 34, 47
 — — белковый состав 34
 — — липидный состав 34
 Менахиноны 45
 Мериоплазмиды 324
 Метиламин 419
 Метилтрансфераза 433
 Метки спинные 209, 210, 296
 Метод деполаризации 216
 — замораживания—скалывания 17, 20-23, 62
 — замораживания—травления 20
 — пэтч-кламп 348-350
 — радиационной инактивации 121
 — смешанных мицелл 257
 Метризамид 27-28
 Миелин 34, 40, 41, 43, 110, 240-241
 Миелинизированный аксон 198
 Микроворсинки 11
 Микросомы 25, 33, 267-268, 271
 Микровязкость 215, 235
 Микротельца, сигналы для сортировки белков 482
 Микротрубочки 183
 Микрофиламенты 182
 Миоинозитол 444
 Миристиновая кислота 38, 165
 Митогенный ответ 450
 Митогены 435, 437
 Митохондриальные переносчики 335
 Митохондрии 11, 14, 33, 39, 482, 488-493
 — белки внутренней мембраны 492
 — — межмембранного пространства 490
 — — наружной мембраны 490
 — дыхательная цепь 267-268, 271-275
 — маркерные ферменты 32
 — система синтеза стероидов 269-271
 Модели каналов и пор 353-358
 Модель бислойная 18-22
 — вращения в конусе 206-207
 — Дэвсона—Даниелли 16, 17
 — жидкостно-мозаичная 16, 17
 — унитарной мембраны Робертсона 16
 Модельные мембранные системы 96-107
 Молекулярное сито 343
 Моноисин 329, 419
 Моноаминоксидаза 32, 249
 Моногалактозилдиацилглицерол 41, 56-57, 83
 Моногалактозилцерамид 43
 Моноглюкозилдиглицерид (МГДГ) 511
 Моноклональные антитела 173
 Моноламеллярные везикулы 104-107, 191, 250-251, 304, 425
 Монослой 97-101
 Морфогенез 410
 Мочевина 303
 Мультиламеллярные везикулы 103
 Мультисубъединичные комплексы 498
 Мутагенез сайт-специфический 375-376
 Натриевый канал 112, 198, 253, 333-337, 344, 358, 367, 499
 — — генетические исследования 368
 Натрия ионы 303, 309, 317, 326
 Нейраминидаза 460
 Нейромедиаторы 435
 Незлектролиты, проницаемость липидных мембран 297-305
 Нигерициин 329
 Ниманна—Пика болезнь 509
 Нистатин 296, 353
 Ноидет Р-40 115
 Норадреналин 435
 Нуклеокапсид 200-202
 5'-нуклеотидаза 32, 165, 412
 NADPaза 462
 Области адгезии 199
 Облегченная диффузия 334
 Обновление фосфолипидов 509
 Овальбумин 479
 Окислительное фосфорилирование 273-275
 Оксидаза D-аминокислот 32
 Оксидазы со смешанной функцией 270
 Оксоил 319, 324
 Октилглюкозид 113-114, 116, 252
 Олеиновая кислота 38
 Олигосахариды 166-167
 Онкогены и передача сигналов 452
 — ретровирусов 452
 Iac-Оперон 373
 Опины 397, 439, 460, 479
 Оптимальная площадь поверхности на молекулу 78-80
 Оптические молекулярные зонды 324
 Органеллы клеток животных 11
 — — растений 11
 Осмотический шок 394
 Пальмитиновая кислота 38, 165
 1-пальмитоил-2-(2-азидо-4-нитробензоил)-sn-глицеро-3-[³H]-фосфохолин 177
 Пальмитоиллизофосфатидилхолин 507
 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолин 71, 507
 Пальмитолеиловая кислота 510

- Параметр упорядоченности 68-72, 214-215, 219
транс-Паринаровая кислота 208
цис-Паринаровая кислота 208
 Пенициллиназа 164-165
 Пенициллинсвязывающие белки 484
 Пептидные гормоны 163
 Пептиды, модели мембранных белков 159-164
 Первичные активные переносчики 334
 Передача сигналов 277, 431-436, 452
 Переиосчик ADP/ATP 120, 378-380, 492, 497
 — арабинозы 335, 373, 376
 — глюкозы 267-269, 335-337, 345, 372-376, 460, 473, 479
 — Na^+ -глюкозы 376
 — катионов 382-388
 — ксилоты 335, 373, 376
 — фосфата 378-381
 — H^+ -фосфата 335
 Переиосчики активные АТФ-зависимые 345, 379-388
 — — стационарное состояние системы 346-348
 — — фосфоенолпируватзависимые 379-388
 — в мембранах 334
 — вторичные активные 334
 — митохондриальные 378
 — первичные активные 334
 — сахаров 335
 Перколла 27-28
 Пермеабиллизация 394
 Пермеаза 334, 337, 345-348
 Пероксидаза хрена 420
 Пероксисомы 14, 32, 482
 Перфорин 393
 Пиноцитоз 413
 Пироллидинхолестерол 209
 Пируватоксидоза 110, 240, 261-263, 281
 Плазмалоген 36-40
 Плазматическая мембрана, барьеры 197
 — — каналы 332-334
 — — проницаемость 303
 — — содержание гликолипидов 399-401
 — — холестерина 399
 — — спермиев 198
 Пластохинон 200, 273, 275-276
 Пластоцианин 199, 268, 275-276
 Плеиочные веса *Лэнгмюра* 15, 97
 Плоские бислоиные мембраны 101-103
 Плотные контакты 12
 Поверхностное натяжение 79, 99
 — — на границе раздела фаз 79
 Поверхностные иммуноглобулины (N-CAM) 397, 402-408
 Поверхностный потенциал мембран 249, 307, 311-321
 Поверхность животной клетки 399
 Пограничный липидный слой 233, 263-264
 Полиеновые антибиотики 296, 353
 Полиизопреноиды 45, 96
 Поли-*L*-лизин 237, 318
 Полимиксин В 295
 Полиоксэтиленовые спирты 114
 Полиоксэтилен-*пара-трет*-октилфенолы 115
 Полипептид-предшественник 466, 469, 470
 Полистироновые смолы 113
 Полиэтиленгликоль 427
 Полиэтиленгликоль-декстран 29
 Порины 123, 146-147, 358, 360-362, 487, 490, 497
 Поры 332-334, 358-370, 392
 Посттрансляционный и котрансляционный переиос 467
 Правило *Овертона* 300-301
 Пребелки 456
 Препролактии 495, 497
 Препромелиттин 496
 Препропаратиреоидный гормон 460, 478
 Препропептид GLa 496
 Препро- α -фактор 468
 Пресс *Френча* 25
 Примахин 419
 Принцип действия противоположных сил 80
 Пробелок оболочки фага M13 459, 473, 496
 Проводимость 306
 Прокаин 295
 Пролipopротенины 495
 Промежуточные филаменты 183
 Проницаемость мембран для протонов 327-328
 Простагландины 447
 Протеинкиназа C 240, 245, 277-280, 288, 443, 446-449, 453
 Протеолипосомы 251-252, 254-256
 — распределение белка 254-257
 Протондвижущая сила 325, 468, 507
 Протонный насос 323, 388, 391
 Протоонкогены 453
 Протромбин 284
 Пурпурная мембрана 34, 46, 197
 Пэтчинг 197
 Работа при переносе иона внутрь мембраны 308-309
 Равновесное распределение молекул 290
 Разделение мембран 26-29
 Разность потенциалов 305
 Разобшающий белок 335, 378-381
 Разрушение клеток 24
 Рак, индукция 453
 Регуляция по типу обратной связи 448
 Рентгеновская дифракция, изучение структуры белков 128-131
 Рентгеноструктурный анализ мембранных липидов 49-54
 Региональ 391-392
 Рецептор аденозинный 440
 — γ -аминомасляной кислоты 335, 362, 397, 436
 — ангиотензиновый 440
 — аспартата 432
 — бактериофага λ 147
 — вазопрессиновый 440
 — глицина 335, 362, 397, 436
 — глутамата 363
 — дофаминовый 440
 — инсулиноподобного фактора роста 397, 437
 — интерлейкина-2 408
 — ЛНП 414, 417, 419, 421-422
 — α_2 -макроглобулина 414
 — маннозо-6-фосфата 398, 414
 — никотиновый ацетилхолиновый 333, 335, 362-367, 397, 436, 498
 — опиатный 440
 — сериновый 434
 — сигнального пептида 478, 496-497
 — субстанции К 397
 — фактора роста нервов 225
 — — — производных тромбоцитов 397, 437
 — — — эпидермиса 397, 401, 414-418, 437, 448-452
 — — — роста-1, стимулирующего образование колоний 397, 437
 — IgA/IgM 397, 405, 414, 423
 — IgG 417
 — IgE 225, 397, 436, 440, 451
 Рецепторы адренергические 435
 — α -адренергические 397, 440, 448
 — β -адренергические 397, 439, 440, 447, 451
 — активация транскрипции 434
 — асиалогликопротеиновые 397, 414, 417-418, 422, 460, 479
 — витронектиновые 397
 — гормонов 126
 — интернализуемые 421-424
 — митогенов 397, 409, 449
 — нейромедиаторов 397
 — определяющие клеточную адгезию 401-412
 — ответственные за тип спаривания у дрожжей 397
 — — — хемотаксис *E. coli* 432
 — реакции аутофосфорилирования 448, 449
 — связывание с компонентами внеклеточного матрикса и белками адгезии 409-411
 — участие в межклеточных взаимодействиях при иммунном ответе 406-409
 — — — передаче сигнала 431-436, 452
 — фибронектиновые 397
 — фосфорилирование 447
 Рибосомы 467
 Рилизинг-фактор кортикотропина 163
 Рифленая фаза 59
 7S-PHK 495
 Родопсин 34, 120, 132, 151-152, 165, 179-180, 225, 227, 232, 239, 440, 451
 Сакситоксин 368
 Сапонины 296, 394
 Саркоплазматический ретикулум 34, 263-264, 382, 383
 Сахараза-изомальтаза 245
 Сахароза 25-27, 119
 Свертывание крови 245
 Светособирающий комплекс, содержащий хлорофиллы *a* и *b* 132
 Связь C—C 64
 Седиментационное равновесие 30-42
 Седиментация 3

- Сериновый рецептор 434
 Сиалилтрансфераза 462, 463
 Сиаловые кислоты 401, 404
 Сигнал-распознающая частица (СРЧ) 471, 475, 479, 495-497
 Сигнальная (лидерная) пептидаза 244, 456, 467, 469, 485, 486, 488, 494
 — последовательность 456, 469-471, 475-479, 484
 — — с-участок 476, 482
 Сигнальные пептиды про- и эукариот 484
 — последовательности синтетические 487
 Сила тока 306
 Силикагель, микрогранулы 29
 Симпорт 334, 371-379
 Синапсис I 183
 Синапсомы 25
 Ситостерол 43
 Слияние мембран 58, 424-431
 — — под действием электрических сил 427
 Соли диазония 175
 — желчных кислот 114, 116
 Сопротивление 306
 Сопряжение не прямое, модель 380
 — прямое, модель 380
 — ферментов 248
 Сорбитол 25
 Состав мембран 33-48
 Спектральные методы 122-124
 Спектры 22, 34, 183-185, 191, 240
 Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) 67, 123
 Спин-меченные ЭПР-зонды 324
 Спиральные метки 209, 210, 296
 Средняя точка перехода 85-86
 Старт-сигнал трансмембранного переноса 480
 Стационарное состояние транспортной системы 346-348
 Стеарил-СoA-десатураза 268, 271
 Стеариновая кислота 38
 Стероиды, система синтеза в митохондриях 269
 Стеролы 36, 43-44, 190
 Стилмастерол 43
 Стирольный зонд di-4-ANEPPS 319
 Стоп-сигнал трансмембранного переноса 458, 480, 490, 492
 Строма 268
 Структуры порообразные 13
 Стыковочный белок (рецептор СРЧ) 496
 Сукцинатдегидрогеназа 110, 125, 268, 273
 Сукцинат—цитохром с-оксидоредуктаза 32
 N-сукцинимидил(4-азидофенил)1,3'-диглиципропионат 127
 Сульфатид 42
 Сульфобетаны 115
 Сульфолипид 41
 Сурфактант легочный 100
 Сфинголипиды 36, 509
 Сфингомиелин 33, 34, 36, 41, 63, 83, 192, 399, 504
 Сфингомиелиназа 189, 509
 Талин 410
 NAR-таурин 175-176
 Твин 80 116
 Текучесть мембран 210-218
 — — измерение 214-219
 — — физиологическое значение 211
 Температура перехода 85
 Теория Гюи—Чапмена 312-315, 317-318
 — свободного объема 211, 225
 — скоростей 340-346
 Теплоемкость 85
 Терминальные оксидазы 118
 Термолитиз 172
 Тетрагидрофолатредуктаза 469
 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат 446
 Тетракани 295
 Тетрафенилборат 297, 303, 309, 319
 Тетрафенилфосфоний 297, 303, 309, 319, 321
 Тетродотоксин 368
 Тиаминпирофосфатаза 462
 Тирозинкиназа 243, 288, 436-437, 448-452
 Тканевой фактор 283
 α -Токсин 123, 394, 474
 — скорпиона 368
 Токсин дифтерийный 393
 — ответственный за ботулизм 393
 — столбнячный 393, 401
 — холерный 393, 401, 441, 442, 484
 Токсины 392, 419, 474
 Тонопласты 382
 Топография мембранных белков 171-181
 Трансдуция 439, 442, 443
 Транскрипция, участие рецепторов 434
 Транслоказы 192, 196, 334
 Трансмембранная асимметрия липидов 187-196, 205
 — миграция липидов 195
 Трансмембранные белки 110, 148-159
 — каналы 305, 332
 Трансмембранный транспорт, переионочки 332-358
 — электрический потенциал 305
 Транспорт веществ 243
 — Cl^- 391
 Транспортные системы, бактериальные периплазматические 389
 — — сопряженные с переносом электронов 390-392
 — — — поглощением света 390-392
 Трансфериновый рецептор 165, 414, 417-419, 423, 448, 460, 478
 Транзитоз 414, 417
 Трехслойная структура («унитарная») 20
 Тринитробензолсульфокислота (ТНБС) 176, 188
 Триплетная метка для мембранных белков 209
 Тритон X-100 113, 115, 116, 251, 253
 — X-114 115
 3-(трифторметил)-3-м-[^{125}I]-иодфенилдиазирин (ТИД) 177
 Тромбоспондин 411
 Тубулин 182
 Тушение флуоресценции 231
 Убиквитин 403
 Убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза 132
 NADPH: убихинон оксидоредуктаза 132, 268, 273, 281
 Убихиноны 45, 96, 273-274
 Увоморулин 406
 Углеводы с длинной цепью 75-78
 Углеводы, ковалентно связанные с белками 166-167
 Удельная проводимость мембраны 339
 Удельное сопротивление 306-307
 — — мембраны 339
 Ультрацентрифугирование аналитическое 119-121
 — равновесное 120
 Ундекапrenoл 44
 Унипортеры 333, 371-379
 Упругие деформации бислоя 237-239
 Уравнение Больцмана 313
 — Гольдмана—Ходжкина—Каца 322, 323
 — Михаэлиса—Ментен 341-342
 — Нернста 322, 324
 — Стокса—Эйнштейна 302
 Уратоксидаза 32
 Фаголизосомы 413
 Фагосомы 413
 Фагоцитоз 413
 Фазовое распределение 28
 Фазовые диаграммы водно-липидных систем 59-60
 Фазовый переход 60, 84-96, 98
 Фактор активации тромбоцитов 45
 — фон Виллебранда 411
 Факторы свертывания крови 240, 282-284
 Фермент II (EII) 388-389
 Ферменты 124, 243-288
 — в везикулах 248
 — влияние на их активность липидов 256-267
 — — поверхностного потенциала 249
 — гетерогенность 247
 — гистерезис 247
 — использующие водорастворимые субстраты 244
 — катализирующие реакции с субстратами, связанными с мембранами 243-245
 — липидзависимые 259-267, 286
 — локализация в мицеллах 246
 Ферменты, образование электрического потенциала 248
 — освобождение от липида 257
 — пищеварительные 244
 — пространственное разделение с субстратом 246
 — растворимые 277-288
 — реконструкция 250-256
 — связь активности с вязкостью мембран 258, 265
 — скрытая активность 248
 — участвующие в канализации субстрата 245
 — — — транспорте веществ 243-244

- — — челночных перемещениях 245
 Ферменты-маркеры 31-32
 Ферредоксин 268, 275
 Ферредоксин-NADP⁺-оксидоредуктаза 275
 Фибриноген 411
 Фибронектин 410, 411
 Фиколл 27
 Филиппин 296
 Флоретин 372, 373
 Флотация 31
 Флуоресцентные зонды 208-219, 296
 Флуоресценция 216, 220
 — тушение 231
 Фодрин 186
 Форболовые эфиры 278-280, 423, 446, 453
 Формилметионилсульфонметилфосфат (ФММФ) 176
 Фосфатидилглицерол 37, 58, 63, 83, 317
 — связывание с белками 232
 — синтез 501-503
 — фазовые переходы 89
 Фосфатидилглицеролфосфатсинтаза 501-503
 Фосфатидилглицеролфосфатфосфатаза 501
 Фосфатидилинозитол 33-34, 37, 83, 165-166
 Фосфатидилинозитол(4,5)бисфосфат (PIP₂) 444
 Фосфатидилсерин 33, 34, 37, 63, 83, 278-280, 317, 508
 — в эритроцитах человека 192
 — взаимодействие с белками 232, 241
 — синтез 501-503
 — скорость «флип-флоп»-переходов 192
 — химическая модификация 188
 Фосфатидилсериндекарбоксилаза 501
 Фосфатидилсеринсинтаза 281, 501-503
 Фосфатидилхолин 33-34, 35-37, 49-54, 58, 63, 65-66, 83, 259-261, 284-288, 317
 — в мембране эритроцитов 191
 — взаимодействие с белками 232, 242
 — — — холестерином 94-96
 — обмен между мембранами 188
 — образование монослоев 99
 — синтез 501-503
 — скорость «флип-флоп»-перескоков 192
 — фазовые переходы 86-91
 NBD-фосфатидилхолин 208
 Фосфатидилэтаноламин 33-35, 37, 52, 57, 63, 65-66, 83
 — в эритроцитах человека 191-192
 — взаимодействие с белками 242
 — связывание ионов металлов 316-317
 — синтез 501-503
 — скорость «флип-флоп»-переходов 192
 — фазовые переходы 87, 89-90
 — химическая модификация 188
 NBD-фосфатидилэтаноламин 208, 225
 Фосфатидная кислота 33, 37, 49-54, 83, 89, 232
 Фосфодиэстераза 439, 442
 Фосфоинозитиды циклические 444
 Фосфолипаза A₂ 188-189, 192-193, 294-288, 439, 442, 447
 — C 188, 244, 438-440, 443-445
 — D 189
 Фосфолипазы 110, 188-190, 244, 284-288, 509
 Фосфолипидные монослои, диаграмма «давление—площадь» 98-100
 Фосфолипидный обмен 188
 Фосфолипиды 33, 34, 36-38, 187-188
 — биосинтез 195, 500-504
 — в эритроцитах человека 191
 — взаимодействие с холестерином 94-96
 — латеральная диффузия 226
 — обновление 509
 — образование монослоев 97-101
 — полиморфизм 236
 — спин-меченные 209, 230-231
 — упаковка молекул в мицеллах 78
 — фазовые переходы 91-94
 — химическая модификация 188
 Фосфоресценция 216, 220
 Фосфофинголипиды 40-41
 Фосфорилирование рецепторов 447
 Фосфотрансферазы бактериальные 388
 Фосфофруктокиназа 282
 CDP: фосфохолин цитидилтрансфераза 280
 Фотообесцвечивание 223
 Фотосинтезирующий аппарат 24
 Фотосинтетические реакционные центры 126-129, 134-139, 155-157, 243, 478, 479
 — — — молекулярная масса 134-137
 — — — простетические группы 134
 — электроитранспортные цепи 267-268, 275
 Фотосистема I 199-200, 268, 275-276
 — II 199-200, 268, 275, 500
 Фториды 442
 Фурье-ИК-спектроскопия 68, 235
 Хаотропные агенты 47
 Харибдотоксин 351-352
 Хемотаксис 431, 432
 Хионин 134, 138-139
 Хлоральгидрат 295
 Хлорид аммония 419
 n-Хлормеркурийбензосульфид 305
 Хлоропласты 11, 15
 — сигналы для сортировки белков 482, 487-494
 — содержание АТФаз 386-388
 — сортировка белков 492
 Хлорохин 419
 Хлорпромазин 295
 Холат натрия 114, 116, 252
 Холестерол 33, 34, 43, 68, 399, 499, 500, 504
 — взаимодействие с фосфолипидами 94-96
 — и текучесть мембран 210
 — распределение в мембранах 95
 — — между двумя сторонами мембраны 190
 — связывание с белками 233
 — спин-меченный (пироллидинхолестерол) 209
 — эфиры 506
 Холестеролоксидаза 190
 Холинплазмалоген 37
 Холинфосфотрансфераза 32
 Холин-рецептор 403
 Цвиттергент 116
 Центрифугирование в градиенте плотности 27-31
 — — — маннитола 28
 — — — метризоата натрия 28
 — — — найкоденза 28
 — — — сорбитола 28
 — дифференциальное 30
 — зональное 26
 — изопикническое 26, 31
 Церамид 41, 399, 400
 Церамид-1-фосфорилглицерол 41
 Церамид-1-фосфорилинозитол 41
 Церамид-1-фосфорилэтаноламин 41
 Цереброзид 42
 Цетилтриметиламмонийбромид 114
 Цианиновые красители 324
 Цианиновый краситель diS-C₃(5) 319
 Цикл *Кребса* 245
 Циклические фосфоинозитиды 444
 Циклический АМР (сАМР) 443
 Цитозоль 32
 Цитоскелет 227
 — участие в формировании доменов 197
 — эритроцитов 181-187, 191, 196
 Цитохалазин 182, 372
 Цитохром b₁ 268
 — b₂ 490, 491
 — b₅ 46, 110, 180-181, 472
 — — реконструкция 251-255
 — — топография 179
 Цитохром b₅-редуктаза 268, 271-272
 Цитохром bc₁-комплекс 273, 491, 492
 Цитохром b/f-комплекс 199, 275-276
 Цитохром c 126, 237, 273-275
 Цитохром c-оксидаза 32, 120, 132-133, 244, 268, 273, 333, 337, 488, 489
 — активный перенос ионов 323
 — в везикулах 248
 — как протонный насос 390
 — реконструкция 252-255
 — связывание с липидами 232
 NADPH—цитохром c-оксидоредуктаза 32
 Цитохром P450 155-156, 221-222, 244, 267-272, 460, 478, 499
 Частицы внутримембранные 22
 — субмитохондриальные 25
 Четырехокислосмия 20, 462
 Число *Фарадея* 305
 Шкала «гидропатии» *Кайта*—*Дулитла* 153-154, 156
 — *Голдмана*—*Энгелмана*—*Стейца* 153-156
 — *Рао* и *Аргоса* 155-156
 Щелевые контакты 12, 197, 358-359
 Щелочная фосфатаза 110, 165, 178
 — фосфодиэстераза 32
 Щеточная каемка 12

- Эйкозаноиды 447
 Экзотоксины А 393, 474
 Экзоцитоз 412, 462-463
 Экзоцитозная система, вторичные сигналы 481-483
 Электрокинетические явления 318
 Электронная микроскопия 20-22
 Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) 212-214, 221
 Электроитранспортные цепи 267-276
 Электрофорез непрерывный в свободном потоке 29
 Эмбриогенез 406
 Эндоплазматический ретикулум 11, 13, 413, 444, 445, 461, 482
 — — встраивание белков 475
 — — гладкий 11, 13
 — — жирнокислотный состав 39
 — — маркерные ферменты 32
 — — миграция липидов 196
 — — шероховатый 11, 13
 β -Эндорфин 163
 Эндосомы 382, 398, 413, 415, 418, 419
 Эндоцитоз 398, 412-424
 Энергизованная мембрана 325
 Энергия Борна 308-310
 — гидратации 308
 — отображения 308, 310
 Энтальпия перехода 86
 Энтропия перехода 85
 Еозины, производные 220
 Еозинмаксимид 209
 Епифлуоресценция 100
 Ергостерол 44
 Еритроциты, цитоскелет 183, 185
 Етаноламинплазмалоген 37
 Еукариотические клетки, сигналы для сортировки белков 482
 Ефиры жирных кислот полистиленсорбита 115
 — холестерина 506
 Эффект архипелага 226
 Ядерные поровые комплексы 360
 Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) 62-63, 68-72, 124, 212-214
 Ядро 482
 «Якорные» белки 110, 111, 476-478, 481

Предисловие к русскому изданию	5
Предисловие	7
Глава 1. Введение: структура и состав биологических мембран	9
1.1. Роль мембран и их разнообразие	9
1.2. Исторический очерк	15
1.3. Морфология мембран	18
1.3.1. Дифракция рентгеновских лучей	18
1.3.2. Электронная микроскопия	20
Дополнение 1.1.	22
1.4. Выделение мембран	23
1.4.1. Разрушение клеток	24
1.4.2. Разделение мембран	26
Дополнение 1.2.	30
1.4.3. Критерии чистоты мембранных фракций	31
1.5. Состав мембран	33
1.5.1. Мембранные липиды	35
1.5.2. Многообразные функции мембранных липидов	44
1.5.3. Мембранные белки	45
1.6. Резюме	48
Глава 2. Структура и свойства мембранных липидов	49
2.1. Жидкие кристаллы	49
2.2. Водно-липидные смеси	54
Дополнение 2.1.	57
2.2.1. Гидратация липидов	57
2.2.2. Фазовые диаграммы однокиспонентных водно-липидных систем	59
2.2.3. Два метода изучения липидного полиморфизма	60
2.2.4. Ориентация полярных головок липидов в бислой	63

2.2.5. Конфигурация и упаковка ацильных цепей в бислое	64	3.6. Принципы структурной организации мембранных белков и способы ее предсказания для трансмембранных белков	148
2.2.6. Методы исследования гидрофобной области бислоя	67	3.6.1. Мембранные белки — это амфифильные соединения	148
2.3. Термодинамика полиморфизма липидных структур	72	3.6.2. Ионизируемые аминокислотные остатки в трансмембранных сегментах	151
2.3.1. Гидрофобные силы	73	3.6.3. Заряженные аминокислоты в сегментах, экспонированных в водную среду	152
2.3.2. Образование мицелл	75	3.6.4. Особая роль пролина?	152
2.3.3. Форма мицелл: почему образуется бислой?	78	3.6.5. Способы идентификации первичных амфифильных структур	153
2.3.4. Форма липидных молекул	83	3.6.6. Способы идентификации вторичных амфифильных структур	157
2.4. Фазовые переходы в липидных системах	84	3.7. Пептиды — модели мембранных белков	159
2.4.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)	85	3.7.1. Природные пептиды	159
Дополнение 2.2.	86	3.7.2. Модельные синтетические пептиды	163
2.4.2. Липидные смеси	91	3.8. Мембранные белки, ковалентно связанные с липидами	164
2.5. Модельные мембранные системы	96	3.9. Мембранные белки, ковалентно связанные с углеводами	166
2.5.1. Монослой на границе раздела фаз воздух — вода	97	3.10. Резюме	167
2.5.2. Монослой на твердой подложке	101		
2.5.3. Плоские бислоевые мембраны	101	Глава 4. Асимметрия мембран	170
2.5.4. Плоские бислоевые мембраны на твердой подложке	103	4.1. Введение	170
2.5.5. Липосомы	103	4.2. Топография мембранных белков	171
2.6. Резюме	107	4.2.1. Методология	172
		4.2.2. Примеры анализа топографии мембранных белков	179
Глава 3. Мембранные белки: характеристика и структурные принципы	109	4.3. Цитоскелет	181
3.1. Структура мембранных белков	109	4.3.1. Микрофиламенты	182
3.2. Очистка мембранных белков	111	4.3.2. Промежуточные филаменты	183
3.2.1. Детергенты	111	4.3.3. Микротрубочки	183
3.3. Характеристика очищенных интегральных мембранных белков	116	4.3.4. Мембрана и цитоскелет эритроцитов	183
3.3.1. Молекулярная масса субъединиц (электрофорез в ПААГ)	117	4.4. Трансмембранная асимметрия липидов	187
3.3.2. Определение молекулярной массы нативного белка с помощью гидродинамических методов	118	4.4.1. Методы установления трансмембранного распределения липидов	188
3.3.3. Метод радиационной инактивации	121	4.4.2. Примеры липидной асимметрии	190
3.3.4. Спектральные методы и вторичная структура	122	4.4.3. Трансмембранная миграция липидов	195
3.3.5. Ферментативная активность	124	4.5. Латеральная гетерогенность мембран	196
3.3.6. Четвертичная структура и химическое сшивание	125	4.5.1. Макроскопические домены и барьеры в плазматической мембране	197
3.4. Изучение трехмерной структуры с помощью рентгеновской дифракции и реконструкции изображения	128	4.5.2. Тилакоидные мембраны	199
3.4.1. Кристаллизация мембранных белков	128	4.5.3. Вирусы с оболочкой	200
3.4.2. Реконструкция изображения и двумерные кристаллы	130	4.5.4. Липидные микродомены	201
Дополнение 3.1	131	4.6. Резюме	203
3.5. Три примера структурных исследований мембранных белков	131		
3.5.1. Структура фотосинтетических и реакционных центров <i>R. viridis</i> и <i>R. sphaeroides</i>	134	Глава 5. Динамическое поведение мембранных систем и липидно-белковые взаимодействия	204
3.5.2. Структура бактериородопсина	139	5.1. Введение	204
3.5.3. Структура поринов	146		

5.1.1. Некоторые простые модели движения мембранных компонентов	206
5.2. Текучесть мембран и применение мембранных зондов	210
5.2.1. Физиологическое значение текучести мембран	211
5.2.2. Характер и скорости движений, измеряемых с помощью ^2H -ЯМР, ЭПР и флуоресцентных зондов	212
5.2.3. Спиновые метки, использующиеся для измерения текучести мембран	214
5.2.4. Флуоресцентные зонды, использующиеся для измерения текучести мембран	215
Дополнение 5.1.	216
5.3. Вращение мембранных белков	219
5.3.1. Примеры вращения белков	221
Дополнение 5.2.	222
5.4. Латеральная диффузия липидов и белков в мембранах ...	222
5.4.1. Модели, описывающие латеральную диффузию	224
5.4.2. Примеры латеральной диффузии компонентов мембран	226
5.5. Липидно-белковые взаимодействия	228
5.5.1. Связывание липидов с внутримембранными белками в бислое	229
Дополнение 5.3.	232
5.5.2. Изменения в липидном бислое, связанные с присутствием интегральных мембранных белков	234
Дополнение 5.4.	236
5.5.3. Динамические свойства остова мембранных белков и их боковых цепей	239
5.5.4. Связывание периферических мембранных белков с липидным бислоем	240
5.6. Резюме	242
Глава 6. Мембранная энзимология	243
6.1. Введение	243
6.2. Некоторые специфические положения, имеющие отношение к активности мембранных ферментов	246
6.3. Реконструкция мембранных ферментов	250
Дополнение 6.1.	251
6.3.1. Некоторые характеристики реконструированных белково-фосфолипидных везикул (протеолипосом)	254
6.4. Влияние липидов на активности мембраносвязанных ферментов	256
6.5. Некоторые примеры липидзависимых ферментов	259
6.5.1. β -Гидроксibuтиратдегидрогеназа (БДГ)	259
6.5.2. Пируватоксидаза	261
6.5.3. Ca^{+} -АТРаза	263

6.5.4. $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -АТРаза	265
6.5.5. Переносчик глюкозы	267
6.6. Мембраносвязанные электроитранспортные цепи	267
6.6.1. Системы синтеза стероидов в митохондриях	269
6.6.2. Микросомные электроитранспортные цепи	271
6.6.3. Дыхательная система митохондрий	273
6.6.4. Фотосинтетическая электроитранспортная система тилакоидов	275
6.7. Взаимодействия между мембранами и растворимыми ферментами	277
6.7.1. Растворимые ферменты, которые при необходимости могут связываться с мембраной	277
Дополнение 6.2.	279
6.7.2. Растворимые ферменты или ферментные ансамбли, которые in vivo могут быть ассоциированы с мембраной	281
6.7.3. Факторы свертывания крови — внеклеточные ферменты, активируемые связыванием с мембраной	282
6.7.4. Фосфолипазы — растворимые ферменты, катализирующие расщепление мембраносвязанных субстратов	284
Дополнение 6.3.	286
6.8. Резюме	288

Глава 7. Взаимодействие низкомолекулярных соединений с мембранами: пространственное разделение, проникаемость и электрические эффекты	289
7.1. Введение	289
7.1.1. Анализ адсорбции лигандов на бислое	289
7.1.2. Классы лигандов, способных взаимодействовать с липидным бислоем	293
7.2. Проницаемость липидных бислоевых мембран для иезлектролитов	297
7.2.1. Проницаемость для воды	304
7.3. Электрические свойства мембран	305
7.3.1. Работа, совершаемая при переносе иона внутрь бислоевой мембраны	308
7.3.2. Потенциал внутренних диполей	309
7.3.3. Поверхностный потенциал мембраны	311
Дополнение 7.1.	316
7.4. Трансмембранный потенциал	321
7.4.1. Измерение трансмембранного потенциала	323
7.4.2. Концепция энергизованной мембраны	325
7.5. Проницаемость липидных бислоевых мембран для ионов	326
7.5.1. Проницаемость для протонов	327
7.5.2. Ионифоры	328
7.6. Резюме	331

Глава 8. Поры, каналы и переносчики	332
8.1. Общие положения	332
8.1.1. Каналы и переносчики: разнообразие функций	336
Дополнение 8.1.	338
8.1.2. Каналы и переносчики как ферменты: применение теории скоростей	340
8.1.3. Анализ стационарного состояния	346
Дополнение 8.2.	347
8.1.4. Регистрация тока, протекающего через одиночный канал: встраивание в плоские мембраны и метод пэтч-кламп	348
Дополнение 8.3.	351
8.1.5. Небольшие молекулы, используемые в качестве моделей каналов и пор	353
8.2. Несколько примеров пор и каналов	358
8.2.1. Щелевые контакты	359
8.2.2. Ядерные поровые комплексы	360
8.2.3. Порины	360
8.2.4. Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR-канал)	362
8.2.5. Потенциалзависимый натриевый канал	367
8.2.6. Кальциевый канал	370
8.2.7. Заключение	370
8.3. Некоторые унипортеры, симпортеры и антипортеры	371
8.3.1. Переносчик глюкозы из мембраны эритроцита	372
8.3.2. Лактозопермеаза из <i>E. coli</i>	373
Дополнение 8.4.	375
8.3.3. Белок полосы 3 — анионный переносчик из мембраны эритроцитов	377
8.3.4. Группа митохондриальных переносчиков	378
8.4. Несколько примеров активных переносчиков, использующих энергию гидролиза АТФ или фосфоенолпирувата	379
8.4.1. Переносчики катионов плазматической мембраны (E_1E_2 -типа): АТФ-зависимые ионные насосы	382
8.4.2. АТФазы F_1F_0 -типа из митохондрий, хлоропластов и бактерий	386
8.4.3. Три других класса переносчиков	388
8.5. Активные транспортные системы, сопряженные с процессом переноса электронов или поглощением света	390
8.5.1. Цитохром <i>c</i> -оксидаза: протонный редокс-насос	390
8.5.2. Бактериородопсин: H^+ -насос, использующий энергию света	391
8.6. Мембранные поры, создаваемые экзогенными агентами ..	392
8.6.1. Токсины и цитолитические белки	392
8.6.2. Пермеабиллизация при помощи детергентов	394

8.6.3. Пермеабиллизация при помощи осмотического шока ..	394
8.6.4. Пермеабиллизация под действием электрического поля ..	394
8.6.5. Пермеабиллизация за счет образования дефектов упаковки мембранных компонентов	394
8.7. Резюме	395

Глава 9. Клеточная поверхность: рецепторы, рециклирование мембран и передача сигналов

9.1. Введение	396
9.2. Поверхность животной клетки	399
9.3. Рецепторы, определяющие клеточную адгезию	401
9.3.1. Связывание бактерий с гликолипидами	402
9.3.2. «Хоминг» лимфоцитов; стволовым кроветворным клеткам тоже нужны гликопроизводные	402
9.3.3. Молекулы, участвующие в клеточной адгезии	403
9.3.4. Рецепторы, участвующие в межклеточных взаимодействиях при иммунном ответе	406
9.3.5. Интегрины — семейство рецепторов, которые связываются с компонентами внеклеточного матрикса и белками адгезии	409
Дополнение 9.1.	410
9.3.6. Другие способы связывания с матриксом и белками адгезии	411
9.4. Повторное использование (рециклирование) мембран и эндоцитоз с участием рецепторов	412
9.4.1. Общие свойства эндоцитозного пути	413
9.4.2. Сортировка компонентов комплекса рецептор — лиганд	416
9.4.3. Клатрин	420
9.4.4. Некоторые примеры интернализуемых рецепторов ...	421
9.5. Слияние мембран	424
9.5.1. Работы с липидными везикулами	424
Дополнение 9.2.	426
9.5.2. Изучение белков, входящих в состав шиповидных структур оболочки вирусов	428
Дополнение 9.3.	429
9.6. Рецепторные системы бактерий обладают некоторыми свойствами, присущими и высшим организмам	431
9.6.1. Рецепторы, ответственные за хемотаксис <i>E. coli</i>	432
9.6.2. Рецепторы, участвующие в активации транскрипции ..	434
9.7. Передача сигналов в животных клетках	435
9.7.1. Первичный ответ и семейства рецепторов	436
9.7.2. G-белки	439
9.7.3. Обновление фосфатидилинозитола и вторые посредники	443

9.7.4. Фосфорилирование рецепторов и десенсибилизация ...	447
9.7.5. Некоторые рецепторы, принимающие участие в передаче сигналов в животных клетках	449
9.8. Онкогены и передача сигнала	452
9.9. Резюме	453
Глава 10. Биогенез мембран	455
10.1. Введение	455
10.2. Общие особенности экзоцитозного пути	461
Дополнение 10.1.	465
10.3. Характерные особенности биосинтеза мембранных белков	466
Дополнение 10.2.	469
10.3.1. Нужны ли для переноса белков каналы?	472
10.3.2. Полипептидные сигналы, отвечающие за сортировку белков и встраивание их в мембраны	475
10.3.3. Сигнальные пептидазы	494
10.3.4. Растворимые и мембраносвязанные белки, необходимые для переноса	495
10.3.5. Сборка мультисубъединичных комплексов и обновление мембранных белков	498
Дополнение 10.3.	499
10.4. Биосинтез и распределение мембранных липидов	500
10.4.1. Где синтезируются мембранные липиды?	501
10.4.2. Транспорт липидов от места их синтеза	504
10.4.3. Обновление фосфолипидов	509
10.5. Изменения липидного состава мембран в ответ на изменения условий окружающей среды	510
10.6. Резюме	511
Приложение	513
Литература	514
Предметный указатель	599

Научное издание
Р.Генис

БИОМЕМБРАНЫ:

Молекулярная структура и функции

Заведующая редакцией канд. биол. наук М. Д. Гроздова

Ведущий редактор Н. Н. Шафрановская

Редактор Н. Ю. Плавинская

Художник В. С. Потапов

Художественный редактор А. Е. Волков

Технические редакторы Л. А. Тихомирова, Л. П. Чуркина

Корректор Г. И. Герман

Лицензия ЛР № 010174 от 20.05.97 г.

Подписано к печати 14.08.97. Формат 60×88¹/₈. Бумага офсетная. Гарнитура таймс.
Усл. печ. л. 39,00. Уч.-изд. л. 45,52. Изд. № 4/8143. Тираж 4000 экз. Зак. 4016 С 030.

Издательство «Мир» Государственного комитета Российской Федерации по печати
129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., 2.

Отпечатано в Производственно-издательском комбинате ВИНТИ
140010, Люберцы, Октябрьский пр-кт, 403

Тел. 554-21-86



9 785030 024196

Издательство «МИР»

**Выпустило в свет перевод последнего,
16-го издания одного из самых известных и
авторитетных учебников медицины**

«Руководство по медицине.

Диагностика и терапия» в 2-х томах

Пер. с англ. — М.: Мир, 1997. — 2000 с., ил., формат 84 × 108/16

С 1899 г. учебник регулярно обновляется и переиздается в США крупнейшей исследовательской фармацевтической фирмой «Мерк и К°», переведен на 12 языков, тиражи его изданий исчисляются миллионами экземпляров. По словам главного редактора американского издания д-ра Р. Беркоу, «причина, почему этот учебник уже почти 100 лет служит библией для врачей, проста — в ней описаны почти все известные болезни человека и представлены новейшие сведения о том, как их лечить».

В подготовке 16-го издания участвовало свыше 300 авторов и консультантов из США, Англии, Канады и других стран. Текст тщательно выверен и отредактирован, благодаря чему книга может служить надежным справочником по всем разделам медицины — от внутренних болезней, педиатрии и гериатрии до спортивной медицины, стоматологии и народной медицины.

Большое внимание в книге уделяется индивидуальному подходу к больному, проведению опроса и первичного обследования; подробно описываются клинические проявления различных расстройств, тактика лечения, возможные меры профилактики.

Руководство предназначено для врачей и студентов-медиков. Оно будет полезно также для среднего медицинского персонала и всех тех, кто интересуется вопросами здоровья и хотел бы иметь подробный медицинский справочник у себя дома.

Приобрести эту и другие книги издательства «Мир» можно в книжных магазинах, непосредственно в издательстве, а также получить по почте наложенным платежом.

Адрес издательства: 129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

Телефоны коммерческой службы: (095) 286-83-88, 286-84-55;

286-82-33; 286-17-72

Факс: (095) 288-9522
